

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**



**Facultad de Ciencias**



**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**Tesis**

**FRECUENCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS  
AISLADAS DEL AGUA DEL RÍO PIURA, PERÚ EN UN TRAMO DE  
LA CIUDAD**

**Presentada por:**

Br. Silvana Elizabeth Palacios Farias

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

**Línea de investigación: Salud Pública**

**Piura - Perú**

**2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**Facultad de Ciencias**



**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**TESIS**

**FRECUENCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS  
AISLADAS DEL AGUA DEL RÍO PIURA, PERÚ EN UN TRAMO  
DE LA CIUDAD**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA**

Br. Silvana Elizabeth Palacios Farias

**EJECUTOR DE TESIS**

Mclgo. Jaime N. Fernández Ponce, M. Sc.

**ASESOR**



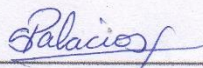
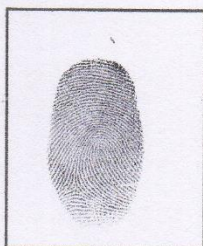
## DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS

Yo: **Silvana Elizabeth Palacios Farias**, identificado con DNI N° **72538985**, Bachiller de Escuela Profesional de **CIENCIAS BIOLÓGICAS**, de la Facultad de **CIENCIAS** y domiciliado en **Apv. Las Casuarinas A-31** del Distrito **PIURA**, Provincia **PIURA**, Departamento **PIURA**. Celular: **914442969**. Email: **silvanapalaciosfarias@hotmail.com**.

DECLARO BAJO JURAMENTO: que la tesis que presento es original e inédita, no siendo copia parcial ni total de una tesis desarrollada, y/o realizada en el Perú o en el extranjero, en caso contrario, de resultar falsa la información que proporciono, me sujeto a los alcances de lo establecido en el Art. N° 411, del código Penal concordante con el Art. 32° de la Ley N° 27444, y Ley del Procedimiento Administrativo General y las Normas Legales de Protección a los Derechos de Autor.

En fe de lo cual firmo la presente.

Piura, 06 de septiembre de 2019

A handwritten signature in blue ink, reading 'Palacios'.

Silvana Elizabeth Palacios Farias

DNI N° 72538985

Art. 411.- El que, en un proceso administrativo, hace una falsa declaración en relación con hechos o circunstancias que le corresponde probar, violando la presunción de veracidad establecida por ley, será reprimido con pena privativa de libertad no menor de uno ni mayor de cuatro años.

Art. 4 Inciso 4.12 del Reglamento del Registro Nacional de Trabajos de Investigación para optar grados académicos y títulos profesionales – RENATI Resolución de Consejo Directivo N°033-2016-SUNEDU/CD.





**UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA**

**Facultad de Ciencias**



**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**TESIS**

**FRECUENCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS  
AISLADAS DEL AGUA DEL RÍO PIURA, PERÚ EN UN TRAMO  
DE LA CIUDAD**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: SALUD PÚBLICA**

Mcblgo. César Augusto Torres Díaz, M.Sc.

**PRESIDENTE DEL JURADO**

Mcblgo. María Dorothy Torres Gallo, M. Sc

**SECRETARIO DEL JURADO**

Mcblgo. Jorge Luis Bermejo Benites

**VOCAL DEL JURADO**





# UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

## FACULTAD DE CIENCIAS



### ACTA DE SUSTENTACIÓN 048 - 2019-UI-FC-UNP

#### FACULTAD DE CIENCIAS

Los Miembros del Jurado Calificador que suscriben, reunidos para evaluar la Tesis denominada **"FRECUENCIA DE *Escherichia coli* RESISTENTE A ANTIBIÓTICOS AISLADAS DEL AGUA DEL RÍO PIURA, PERÚ EN UN TRAMO DE LA CIUDAD"**, presentada por la señorita Bachiller **SILVANA ELIZABETH PALACIOS FARIAS**, con el asesoramiento del **Mcbigo. Jaime Napoleón Fernández Ponce, MS.c.**; oídas las observaciones y respuestas a las preguntas formuladas, y de conformidad al Reglamento de Tesis para obtener el Título Profesional en la Facultad de Ciencias, la declaran:

**APROBADA (✓)**

**DESAPROBADA ( )**

Con la mención de:

**MUY BUENO**

(✓) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo de Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**.

(⊕) En consecuencia, queda en condición de ser ratificado por el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Piura, y recibir el **TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**; después que la sustentante incorpore la sugerencia del Jurado Calificador.

Piura, 13 de agosto de 2019.

**UNP**

**Mcbigo. CÉSAR AUGUSTO TORRES DÍAZ, MS.c.**  
PRESIDENTE DE JURADO DE TESIS

**Mcbigo. MARÍA DOROTHY TORRES GALLO, MS.c.**  
SECRETARIO DE JURADO DE TESIS

**Mcbigo. JORGE LUIS BERMEJO BENITES**  
VOCAL DE JURADO DE TESIS



Campus Universitario - Urb. Miraflores S/N. Castilla  
PIURA - PERU

## **DEDICATORIA**

A:

Dios por permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional, llenarme de bendiciones cada día y llevarme de su mano por el camino que me permitirá alcanzar todos mis objetivos.

Mi madre Renée Farias por ser el mayor ejemplo de fortaleza, perseverancia, dedicación y superación; por todo su esfuerzo para que juntas lográramos esta meta, por su confianza y por haberme hecho el ser humano que soy.

Mi padre Augusto Palacios por su ejemplo de entereza, sabiduría y fortaleza que lo caracterizan y que me ha infundido siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

Joann Herrera por acompañarme durante todo este proceso, brindándome apoyo en los momentos difíciles y por infundirme paciencia cuando creí que esto no sería posible.

Mi hermano Gerardo por su apoyo y compañía durante todos los años de mi vida.

Mi sobrino Hugo por ser la luz de mi vida y para que veas en mí un ejemplo a seguir.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la fortaleza necesaria para seguir en este largo proceso y hacerme acreedora de grandes personas como Joann Herrera Talledo que sin su aporte hubiese sido imposible para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello debo agradecer en este pequeño espacio a mis padres que me dieron la gran oportunidad de estudiar esta hermosa carrera, y apoyarme con los medios económicos en la realización de este trabajo.

Además, debo agradecer de manera muy especial y sincera a mi asesor Mtblgo. Jaime Fernández Ponce por aceptarme para realizar esta tesis de pre grado bajo su dirección. Su permanente predisposición, su paciencia, sus consejos y apoyo aportando todos sus conocimientos ha sido una contribución invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación académica. Al laboratorio de Bioquímica de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Piura, al técnico encargado del laboratorio el Sr. Domínguez por haberme dado la oportunidad de trabajar en estas instalaciones, ya que sin su colaboración esto no hubiera sido posible.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA .....	4
1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA.....	4
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	6
1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN .....	7
1.4. OBJETIVOS.....	7
1.5. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN .....	8
CAPITULO II: MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. ANTECEDENTES:.....	9
2.1.1. A nivel mundial .....	9
2.1.2. América .....	9
2.1.3. Perú.....	10
2.2. BASES TEÓRICAS .....	11
2.2.1. Bacterias .....	11
2.2.2. Coliformes .....	13
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> .....	14
2.2.4. Antibióticos del perfil de resistencia .....	15
2.2.5. Antibióticos para la determinación de betalactamasas .....	17
2.2.6. Resistencia bacteriana a antibióticos .....	18
2.2.7. <i>Escherichia coli</i> productoras de BLEE .....	19



2.2.8. El río Piura.....	21
2.3. GLOSARIO DE TÉRMINOS BÁSICOS .....	23
2.4. HIPÓTESIS .....	24
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....	25
3.1. ENFOQUE Y DISEÑO.....	25
3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
3.2.1. Población.....	25
3.2.2. Muestra.....	25
3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS .....	25
3.3.1. Recolección de muestras .....	25
3.3.2. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> .....	26
3.3.2.1. Prueba de oxidasa: .....	26
3.3.2.2. Prueba en agar hierro y triple azúcar (Triple Sugar Iron Agar):.....	27
3.3.2.3. Prueba de descarboxilasa (Agar lisina hierro): .....	27
3.3.2.4. Prueba de citrato (agar citrato de Simmons): .....	28
3.3.2.5. Prueba de movilidad (Medio SIM):.....	28
3.3.2.6. Prueba de rojo de metilo (Medio MR-VP): .....	29
3.3.2.7. Prueba Voges-Proskauer (Medio MR-VP):.....	29
3.3.2.8. Fermentación de carbohidratos: .....	30
3.3.3. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos .....	30
3.3.4. Pruebas de tamizaje para cepas productoras de BLEE.....	32
3.3.5. Prueba confirmatoria para cepas productoras de BLEE.....	33

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	34
4.1. RESULTADOS .....	34
4.2. DISCUSIÓN.....	41
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES .....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
ANEXOS.....	60

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.3.3.1. Halos de inhibición de la sensibilidad antibiótica según el <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (CLSI) de enero del 2018 27th ed. para <i>E. coli</i> .....	31
Tabla 3.3.4.1. Halos de inhibición según el <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (CLSI) de enero del 2018 27th ed. para seleccionar las cepas probables productoras de $\beta$ -lactamasas de espectro extendido.....	32
Tabla 4.1. Cepas resistentes a antibióticos en aislamientos de <i>E. coli</i> .....	35
Tabla 4.2. Porcentaje de resistencias de cepas de <i>E. coli</i> a uno o a más de un antibiótico.....	36
Tabla 4.3: Aislamientos de cepas de <i>E. coli</i> por mes y por puntos de muestreo.....	38



## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1. Porcentajes de bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas del agua del río Piura.....	34
Gráfico 4.2. Frecuencia de <i>E. coli</i> aisladas del agua del río Piura.....	34
Gráfico 4.3. Porcentajes de cepas de <i>E. coli</i> resistentes a antibióticos.....	35
Gráfico 4.4. Porcentajes de resistencia a antibióticos en aislamientos de <i>E. coli</i> .....	36
Gráfico 4.5. Porcentaje de <i>E. coli</i> productoras de BLEE y porcentaje de <i>E. coli</i> no productora de BLEE.....	37
Gráfico 4.6. <i>Escherichia coli</i> productores de betalactamasas de espectro extendido aisladas del río Piura en el punto uno entre agosto 2018 y enero 2019.....	38
Gráfico 4.7. Frecuencia de aislamiento de <i>E. coli</i> por punto de muestreo.....	39
Gráfico 4.8. Recuentos de bacterias lactosa-positiva y lactosa-negativas en agar Mc Conkey, aisladas de aguas del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú.....	39
Gráfico 4.9. Recuentos de bacterias en agar Mc Conkey, en el río Piura, en un tramo de la ciudad, entre agosto de 2018 y enero de 2019.....	40

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías.....	60
Anexo 2. Fórmula y preparación de los medios de cultivo empleados.....	68
Anexo 3. Recuento de UFC/ml por punto de muestreo.....	72
Anexo 4. Promedios de pH, temperatura del aire y temperatura del agua.....	74
Anexo 5. Otras bacterias aisladas de aguas del río Piura.....	76
Anexo 6. Tabla de identificación bioquímica de <i>Escherichia coli</i> .....	77

## RESUMEN

Se aisló *Escherichia coli* resistente a ciertos antibióticos y productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), de aguas del río Piura, Perú, entre agosto de 2018 y enero de 2019. Las muestras de agua se obtuvieron de tres puntos donde el río atraviesa la ciudad de Piura y para el aislamiento bacteriano se utilizó el agar Mc Conkey mientras que la determinación de la especie se efectuó por métodos bioquímicos. Para la investigación de la resistencia antibacteriana por antibióticos se realizó el antibiograma con discos de sensibilidad para ampicilina, amikacina, cefotaxima, ciprofloxacino, gentamicina y sulfametoprim, mientras que la búsqueda de cepas productoras de BLEE se hizo con una prueba de tamizaje y se confirmó por el método de Jarlier. Se encontró 31 cepas de *E. coli* que correspondieron al 5,47% del total de aislamientos. De las cepas de *E. coli* aisladas, 80,6% fueron resistentes a ampicilina; 41,9%, a sulfametoprim; 35,5% a cefotaxima y 35,5% a ceftriaxona. Además, el 16,1% de las cepas fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido. Dada la presencia de cepas de *E. coli* resistentes, existe un gran riesgo de contaminaciones e infecciones con estos microorganismos a partir de aguas del río. La producción de BLEE en los cultivos hallados debe ser motivo de preocupación por las posibles consecuencias contra la salud pública.

Palabras clave: *Escherichia coli*, río Piura, antimicrobianos, perfil de resistencia, BLEE.



## ABSTRACT

*Escherichia coli* was isolated from antibiotics and produced extended spectrum beta-lactamases (ESBLs), from the water in Piura river, Perú, between August 2018 and January 2019. The water samples were obtained from three points of Piura, where it meets the city of Piura with the river to stop the bacterial from spreading of Mc Conkey agar was used to determinate of the species was carried out by biochemical methods. From the investigation of antibacterial resistance by antibiotics, an antibiogram was performed with sensitivity discs for ampicillin, amikacin, cefotaxime, ciprofloxacin, gentamicin and sulfametoprim, while the search for ESBLs producing strains was made with a screening test and confirmed by the Jarlier's method. 31 strains of *E. coli* were found, corresponded to 5,47% of the total isolated. Of the strains of *E. coli* isolated, 80,6% were resistant to ampicillin, 41,9% to sulfametoprim, 35,5% to cefotaxime and 35,5% to ceftriaxone. In addition, 16,1% of the strains were producers of extended spectrum beta-lactamases. Given the presence of resistant strains of *E. coli*, there is a big risk of contamination and infections with these microorganisms from the water in Piura. The production of ESBLs in the crops found should be cause for concern about the posible consequences against public health.

Key words: *Escherichia coli*, Piura river, antimicrobial, resistance profile, ESBLs.

## INTRODUCCIÓN

Según estudios epidemiológicos, América Latina se encuentra entre las regiones con más alta incidencia de brotes nosocomiales producidos por bacterias que presentan resistencia a múltiples antibióticos. También, en los últimos años se ha visto un interés marcado por evidenciar la presencia de mecanismos de resistencia cruzada tanto para antisépticos y desinfectantes como para antibióticos (Cabrera, Gómez, & Zúñiga, 2007).

El desarrollo y diseminación de bacterias resistentes a antimicrobianos está generando una preocupación creciente ya que las bacterias resistentes producen infecciones difíciles de tratar y de controlar. La farmacoterapia para dichas infecciones es costosa y en muchos casos no disponible para un gran grupo de población. En consecuencia, estas propiedades de resistencia bacteriana se están convirtiendo en un problema sanitario, ecológico y económico (Nuñez, Tornello, Puentes, & Moretton, 2012).

El desarrollo industrial y la creciente urbanización han causado graves problemas ambientales debido al vertimiento de efluentes industriales y domésticos en diferentes ecosistemas. La liberación de compuestos tóxicos y bacterias patógenas resistentes a varios químicos, presentes en aguas residuales, constituyen la causa principal de la contaminación de los ecosistemas acuáticos, en particular los ríos. Los efectos de la contaminación han conllevado a la degradación de los recursos hídricos y a la disminución de la calidad de las aguas disponibles para el abastecimiento de la población, así como para el uso agrícola e industrial (Martínez, y otros, 2010).

La exposición continua del ambiente a la contaminación va originando mayores riesgos para la salud, considerables en países en vías de desarrollo, en los cuales la pobreza, la nula inversión en tecnología y la escasa legislación sobre protección al ambiente, han dado como resultado altos niveles de contaminación (Rivera & Cedillo, 2005).

En la naturaleza, el agua adquiere una variedad de constituyentes mediante el contacto con la atmósfera (gases), contacto con la tierra (minerales) y por el contacto con ambientes

contaminados por el hombre (sustancias orgánicas e inorgánicas). La contaminación orgánica consiste en una acumulación exagerada de moléculas originadas por los organismos, compatibles con la vida y, generalmente, degradables. La contaminación inorgánica resulta de sustancias poco frecuentes en estado natural o sustancias nuevas, a las cuales los organismos no han tenido ocasión de adaptarse y que pueden penetrar en las células para alterar determinados mecanismos fisiológicos fundamentales. Su mecanismo de acción explica que basten concentraciones mínimas para producir efectos negativos en los seres vivos (Rivera & Cedillo, 2005).

La resistencia bacteriana de *Escherichia coli* a los antibióticos se relaciona con el consumo de éstos ya que la presión selectiva que ejercen favorece la creación, adaptación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (Sánchez, et al., 2003). Las bacterias tienen defensas intrínsecas y extrínsecas que las protegen de los antibióticos, la resistencia bacteriana intrínseca es una característica inherente de las bacterias que evita la acción de los antibióticos; por ejemplo, algunas paredes celulares bacterianas impiden la entrada de los antibióticos o contienen bombas que expulsan a los antibióticos desde el interior de la célula (Tucto-Succhil, Mercado-Martínez, & Hurtado-Escamilo, 2014).

La resistencia bacteriana extrínseca o adquirida resulta de la exposición inadecuada de las bacterias a los antibióticos produciéndose cepas resistentes. Se ha detectado una progresiva disminución en la sensibilidad de estos microorganismos a los antimicrobianos utilizados habitualmente para el tratamiento de infecciones, por ejemplo, de tracto urinario (Tucto-Succhil, Mercado-Martínez, & Hurtado-Escamilo, 2014).

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública mundial con consecuencias graves de morbilidad y mortalidad en los hospitales y con pérdidas económicas para las instituciones de salud (Silva, 2006).

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la existencia de *Escherichia coli* resistente a antibióticos en agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, durante agosto de 2018 y enero de 2019.



Se encontró 31 cepas de *E. coli* que correspondieron al 5,47% del total de aislamientos. De las cepas de *E. coli* aisladas, 80,6% fueron resistentes a ampicilina; 41,9%, a sulfametoprim; 35,5% a cefotaxima y 35,5% a ceftriaxona. Además, el 16,1% de las cepas fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido.

El informe se desarrolla en varios capítulos. El primer capítulo se refiere a distintos aspectos de la problemática, mientras que en el segundo capítulo se desarrolla el marco teórico del tema, tanto los antecedentes como las bases teóricas del problema. El tercer capítulo se refiere al marco metodológico y en el cuarto capítulo se presentan los resultados y se discuten los mismos.

# **CAPITULO I: ASPECTOS DE LA PROBLEMÁTICA**

## **1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA**

El rápido y constante aumento de infecciones causadas por bacterias patógenas resistentes a antibióticos está produciendo una «carrera armamentística», evolutivamente hablando, en la que el desarrollo de nuevas armas por el hombre (antibióticos) se encuentra por detrás de la capacidad de los microorganismos para evitar su efecto (aumento de resistencia) (Bécares, Martín, Hijosa, & Sidrach-Cardona, 2011).

Los elevados niveles de resistencia a los antimicrobianos han incrementado los problemas relacionados con las enfermedades infecciosas, haciéndose cada vez más necesario el uso de nuevos antimicrobianos, que resultan ser más costosos y tóxicos para el hombre (Gonzales, 2016). El deterioro de la situación ha sido cada vez mayor por el uso creciente de los antibióticos en todo el mundo; en muchos países no han existido políticas restrictivas y donde las ha habido no han sido eficaces para evitar el abuso de los antibióticos (Mendoza, 2011).

La causa de la resistencia es natural, es decir, las propias bacterias han desarrollado mecanismos para inactivar las sustancias antibióticas como elemento de defensa o estrategia competitiva con otros microorganismos. Esta resistencia bacteriana está potenciada por la actividad humana en cuanto al uso de antibióticos para el tratamiento de enfermedades. En este caso, el mecanismo selectivo impuesto por el hombre, al aumentar la probabilidad de contacto de los antibióticos con las bacterias, ha provocado una rápida selección de las poblaciones bacterianas, favoreciendo a las resistentes. Aunque la disminución de la susceptibilidad a antibióticos puede aparecer en ausencia de éstos, por mutación genética, ha sido el uso excesivo y no controlado de los antimicrobianos lo que ha provocado un incremento alarmante de resistencias que, incluso, ha llevado a adoptar medidas legales, restringiendo su libre adquisición (Bécares, Martín, Hijosa, & Sidrach-Cardona, 2011).

La resistencia a antibióticos puede atribuirse a diferentes mecanismos; sin embargo, el mecanismo más frecuente e importante, desde el punto de vista terapéutico en bacilos Gram

negativos, es la producción de enzimas tipo betalactamasas. Las infecciones causadas por microorganismos productores de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) son difíciles de manejar y la terapia empírica a menudo fracasa; además, estos organismos tienden a ser resistentes a otros antimicrobianos incluyendo las fluoroquinolonas y aminoglucósidos (Colquechagua, Sevilla, & Gonzales, 2015).

El aumento mundial de las bacterias resistentes a los antibióticos en el medio ambiente hace imperativo la vigilancia de la presencia y distribución de las bacterias y de genes de resistencia procedentes de los centros médicos y veterinarios, problemática que incluye a las aguas superficiales y a las aguas subterráneas, de donde también se han aislado bacterias multirresistentes (Acevedo, Severiche, & Jaimes, 2015).

La frecuencia y nivel de resistencia de la bacteria a un antibiótico varía con relación a una serie de factores. La resistencia puede variar en el tiempo; además, va a ser diferente en distintas áreas geográficas, dependiendo de si la bacteria reside en la comunidad o en un centro de atención de salud, y dentro del mismo el nivel de resistencia va a variar según el nivel de complejidad de la unidad hospitalaria, de tal forma que existen una serie de factores de la práctica médica diaria que influyen sobre este fenómeno, tales como la frecuencia en el uso de antibióticos en el sistema, uso racional de los mismos y la variación genética espontánea e inducida por la presión selectiva de los antimicrobianos sobre determinados gérmenes (Sanders & Sanders, 1992)

Las enterobacterias resistentes a los antibióticos se liberan en las aguas a partir de la orina, heces, eventualmente cadáveres y estiércol, que usan como ruta principal las aguas residuales de los hospitales, efluentes municipales, de la industria ganadera y piscícola, que se constituyen probablemente en las mayores fuentes de bacterias y de genes de resistencia a antibióticos que se vierten en el medio ambiente (Acevedo, Severiche, & Jaimes, 2015).

Uno de los principales efectos incluye la toxicidad aguda o crónica para especies de plantas y animales expuestos a estos fármacos, debido principalmente a que la mitad de los antibióticos administrados a los seres humanos y los animales se excreta en forma activa sin

cambios, principalmente a través de la orina y heces fecales. Se reporta una absorción incompleta de hasta del 95 % de los antibióticos administrados y la producción de sus metabolitos; estos últimos pueden ser más tóxicos que el compuesto original y pueden llegar a acumularse en todas las matrices ambientales (Acevedo, Severiche, & Jaimes, 2015).

A pesar de los avances en medicina y farmacología, son muchas las personas que mueren hoy en día debido al problema de la multirresistencia bacteriana a los antibióticos. La rápida aparición y diseminación de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos plantea una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública, siendo un problema creciente en el mundo que involucra cada día nuevas especies bacterianas y nuevos mecanismos de resistencia. El uso indiscriminado de los antibióticos en prácticas médicas veterinarias y pecuarias contribuye a la dispersión de bacterias resistentes. Adicionalmente, es común que los centros de salud, especialmente hospitales, viertan sus aguas residuales a la red pública y que se constituyan en importantes focos de contaminación de aguas continentales, marino costeras y sus sedimentos. La presión selectiva ejercida mediante el uso excesivo de antibióticos, junto a los diversos mecanismos de transferencia genética que portan las bacterias, contribuyen cuantiosamente a esta situación (Castañeda, López, Figueroa, & Fuentes, 2009).

Se sabe que la resistencia bacteriana es un problema a nivel mundial y más aún porque estas bacterias son liberadas al ambiente desde diversas fuentes contaminantes; por ello, en el presente trabajo se investigó la presencia de cepas de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aisladas del agua del río Piura.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Existen cepas de *Escherichia coli* resistentes a antibióticos en agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú?

### 1.3. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

La resistencia bacteriana es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un problema mundial que está ocasionando serios inconvenientes para combatir las enfermedades. Además, hay una situación de escasez de información sobre el tema en países como Perú, así como sobre *Escherichia coli*, que es un indicador de contaminación fecal existente en el río Piura y, sobre todo, de los perfiles de resistencia a antibióticos betalactámicos de espectro extendido de dicha bacteria aisladas de estas aguas. Es por eso que se realizó esta investigación para dar a conocer a las autoridades, al sector salud y al público en general, la contaminación que está sufriendo el río Piura, cuyas aguas son utilizadas por la población que vive en sus cercanías para el riego de cultivos y la pesca artesanal, así como para la alimentación de animales de ganado y mascotas. También se emplea en la realización de actividades recreativas, como la natación en diferentes zonas del río, a pesar de que sus aguas no cumplen con los parámetros de calidad microbiológica; lo que conlleva a la diseminación de estas cepas resistentes que pueden causar problemas graves en la salud de los seres vivos. Por lo tanto, el uso de aguas contaminadas causa riesgo higiénico-sanitario para todas las personas que de forma directa o indirecta emplean las aguas en diferentes actividades.

### 1.4. OBJETIVOS

El objetivo general fue determinar la existencia de *Escherichia coli* resistente a antibióticos en agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, durante agosto de 2018 y enero de 2019.

Los objetivos específicos fueron:

- Aislar e identificar *Escherichia coli* de muestras de agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, durante agosto de 2018 y enero de 2019.

- Determinar la resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* aisladas de agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, durante agosto de 2018 y enero de 2019.
- Establecer las cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas de agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, durante agosto de 2018 y enero de 2019.
- Calcular la frecuencia de *Escherichia coli* resistente a antibióticos aisladas de agua del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, durante agosto de 2018 y enero de 2019.

## 1.5. DELIMITACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Las muestras se colectaron durante los meses de agosto 2018 a enero 2019; se recogieron 40 muestras de agua de cada uno de tres puntos de muestreo definidos en un tramo del río Piura, haciendo un total de 120 especímenes:

- Primer punto de muestreo, se encuentra frente al lugar denominado ex Toyota; con geoposicionamiento 5°11'35.6"S 80°37'24.6"W.
- Segundo punto de muestreo, está ubicado a la altura del centro comercial Divermotor, con geoposicionamiento 5°11'02.0"S 80°37'29.0"W.
- Tercer punto de muestreo, a 1000 metros río arriba del segundo punto, a la altura de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Nacional de Piura, con geoposicionamiento 5°10'30.9"S 80°37'18.5"W.



## **CAPITULO II: MARCO TEÓRICO**

### **2.1. ANTECEDENTES:**

#### **2.1.1. A nivel mundial**

En España se determinó la existencia de bacterias resistentes a antibióticos a lo largo de las aguas del río Bernesga en la Provincia de León. En los muestreos realizados entre el agua del río, los sedimentos y los vertidos fueron aisladas 289 colonias de *E. coli* y se analizaron sus patrones de resistencia a antibióticos. Se demostraron tasas de resistencia tanto a la eritromicina como a la penicilina del 100%, seguidos de la ampicilina con porcentajes entre el 70 y 90% de resistencia, mientras que en el caso de la azitromicina el porcentaje de bacterias resistentes no superó el 35% en ningún punto (Bécares, Martín, Hijosa, & Sidrach-Cardona, 2011).

En Nueva Zelanda, se observó que el 70% de los coliformes aislados en ambientes marinos mostró resistencia a uno o más antibióticos, encontrándose mayor resistencia a ampicilina, sulfafurazola y rifampicina; también se evaluó la resistencia a antibióticos en moluscos bivalvos obtenidos de la misma zona, encontrando resistencia principalmente a ampicilina (77.3%) y cefalotina (57.0%) (Cooke, 1976).

En el mar Báltico, en Finlandia, se evaluó la sensibilidad antibiótica de 487 cepas de *E. coli*, las cuáles mostraron una menor susceptibilidad a sulfonamida (14%) y tetraciclina (16%); el 12% de las muestras presentó resistencia a dos o más antibióticos (Niemi, Sibakov, & Niemela, 1983).

#### **2.1.2. América**

En Puebla, México, se comprobó la existencia de bacterias multirresistentes a los antimicrobianos en las aguas de los ríos Alseseca y Atoyac. Los antibióticos probados fueron kanamicina (KM), ampicilina (AP), tetraciclina (TC) y cloranfenicol (CM), y se concluyó que la multirresistencia es más común en bacterias provenientes de aguas residuales municipales e

industriales, siendo el 90% coliformes fecales (Castillo, Martínez, López, Ticante, & Muñoz, 2007).

En Costa Rica, cepas de *E. coli* aisladas de aguas residuales hospitalarias fueron resistentes a antibióticos en el 90% de las muestras analizadas. Los mayores niveles de resistencia fueron a los  $\beta$ -lactámicos. La ampicilina resultó ser el antimicrobiano hacia el cual se detectó un mayor porcentaje de resistencia en los aislamientos de *E. coli* con un 91%, seguido de la amoxicilina con un porcentaje de 89 % (Tzoc, Arias, & Valiente, 2004).

En Cuba se aislaron cepas de *Escherichia coli* procedentes de los ríos capitalinos Almendares, Quibú y Luyanó; los mayores porcentajes de resistencia se observaron frente a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim y ciprofloxacina (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012).

En Argentina se obtuvieron cepas resistentes a antibióticos aisladas de aguas grises en un canal de Ingeniero Budge, en Buenos Aires, en las cuales se observó una mayor resistencia a ampicilina con un 34 %, seguida por las bacterias resistentes a cefalotina 17 % (Nuñez, Tornello, Puentes, & Moretton, 2012).

### **2.1.3. Perú**

En Piura y Sechura, se obtuvieron cepas de coliformes termotolerantes aislados de medios acuáticos, a las cuáles se les determinó su resistencia antibiótica. 33% de las bacterias presentaron resistencia hacia la ampicilina; 25,9%, al ácido pipemídico; 20,4%, a la nitrofurantoína, y, 13% al ácido nalidíxico y fosfomicina. Además, se identificaron valores de sensibilidad intermedia frente a los antimicrobianos ampicilina, ácido pipemídico, ácido nalidíxico, cefaclor, fosfomicina, nitrofurantoina y ciprofloxacina. No se encontró ningún tipo de resistencia frente a amikacina, gentamicina y sulfatrimetoprim, a los cuales los coliformes fueron 100% sensibles (Pintado, 2015).

En Sechura se evaluó la sensibilidad antibiótica de muestras de *E. coli*, de las cuáles el 100% resultó ser sensibles a meropenem, mientras que 36,11% presentaron resistencia a cefotaxima; 25,93%, a cefepime, y, 23,15% a ceftazidima. El 55.56% de los aislados resultaron resistentes a uno o más antibióticos, pero solo uno de ellos fue multirresistente a cinco antibióticos (5.56%) (Alejos, 2017).

En Lima, en las bahías de Pucusana, Miraflores y El Callao se obtuvieron cepas de *E. coli* resistentes al mercurio; a éstas se les realizó pruebas de resistencia a los antibióticos logrando el siguiente patrón: ampicilina (19.5%), amoxicilina (17.1%) y sulfametoxazol-trimetoprima (17.1%). Se observó baja resistencia al ácido nalidíxico (7,32%), amikacina (4,88%), cloranfenicol (2,44%), aztreonam (2,44%) y kanamicina (2,44%) (Sulca & Alvarado, 2018). Asimismo, en el circuito de playas de la Costa Verde se evaluó la sensibilidad antibiótica de 100 cepas de coliformes, y se determinó que la susceptibilidad antibiótica fue menor para ampicilina y mayor para ceftazidima y amikacina (Benvenuto, 2017).

## **2.2. BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1. Bacterias**

Las bacterias son organismos procarióticos que tienen una estructura sencilla cuando se comparan con los eucariotas; sus formas y tamaños son variados. De acuerdo a su forma las bacterias pueden ser bacilos, cocos y espirilos. El tamaño puede oscilar desde las más pequeñas (nanobacterias), con un diámetro menor que 0,2  $\mu\text{m}$ , a las de mayor tamaño, de longitud alrededor de los 500  $\mu\text{m}$  (espiroquetas). Se reproducen por fisión binaria, la mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como *Chlamydias* y *Rickettsias* (Lizarbe, 2009).

Las bacterias poseen diversas estructuras que les sirven para realizar diferentes funciones. Si se describieran desde la parte más externa a la interna, en primer lugar, se encontraría a la

cápsula (no todas las bacterias la poseen); esta estructura está conformada por cadenas de azúcares o proteínas unidos fuertemente. Otras estructuras externas en algunas bacterias son las fimbrias y los *pili* que les sirven, respectivamente, para anclarse a otras células y para intercambiar material genético entre estos microbios. También están los flagelos, los cuales tampoco se encuentran en todas las bacterias; son filamentos de proteína (flagelina) que le sirven a la bacteria para moverse de un lado a otro (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009; Chávez-Castillo, Arreguín-Espinosa, Cifuentes-Blanco, & Rodríguez-Bustamante, 2017).

Por otra parte, una estructura que sí poseen casi todas las bacterias es la pared celular. En las bacterias Gram positivas se trata de una capa más gruesa formada por peptidoglucano. En las bacterias Gram negativas, la delgada pared celular se encuentra atrapada entre dos membranas de lípidos: la membrana externa y la membrana interna. La membrana citoplásmica delimita el interior y exterior de las bacterias y está presente en todas las especies bacterianas. Se compone de una doble capa de fosfolípidos, los cuales son elementos grasos que también se unen a proteínas y carbohidratos. Dicha membrana está en contacto directo con el citoplasma, donde coexisten vitaminas, iones, agua, nutrientes, desechos y el material genético (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009; Chávez-Castillo, Arreguín-Espinosa, Cifuentes-Blanco, & Rodríguez-Bustamante, 2017).

Unas estructuras muy interesantes en estos microorganismos son las endosporas, células especializadas que pueden producirse en bacterias de los géneros *Clostridium* y *Bacillus*; confieren resistencia ante las condiciones adversas del ambiente. Las bacterias por lo general tienen un cromosoma compuesto de ADN que no está protegido por una membrana. El lugar que ocupa el ADN bacteriano se denomina nucleoide. Por lo regular, se forma una cadena circular que mide entre un millón y seis millones de pares de bases. Es aquí donde se encuentran agrupados todos los genes de la bacteria, los cuales contienen la información para producir las proteínas que éstas necesitan para sobrevivir. A veces existen genes bacterianos que no están agrupados en esta cadena circular, sino en una más pequeña denominada plásmido, donde puede encontrarse la información que les confiere a las bacterias, por ejemplo, la resistencia a antibióticos o la

capacidad de metabolizar –sin sufrir daño– sustancias tóxicas provenientes del petróleo. De hecho, algunas de estas últimas se usan para limpiar derrames petroleros (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009; Chávez-Castillo, Arreguín-Espinosa, Cifuentes-Blanco, & Rodríguez-Bustamante, 2017).

Las bacterias son capaces de asociarse con otros organismos. Estas asociaciones se pueden clasificar como comensalismo, mutualismo y parasitismo. Las bacterias comensales son ubicuas, es decir, se encuentran en todas partes, y son capaces de crecer sobre animales y plantas. En este tipo de interacciones, el animal o la planta no se ve seriamente perjudicado y convive en relativa paz con las bacterias; ejemplo de ello son las especies bacterianas que habitan en nuestra piel y boca. En el mutualismo las bacterias forman asociaciones útiles con otros organismos, que son imprescindibles para su supervivencia y de las cuales ambos resultan beneficiados. Por otra parte, en el parasitismo las bacterias son beneficiadas y el hospedero (animal o planta) es perjudicado (Lizarbe, 2009).

### **2.2.2. Coliformes**

Coliforme es un término que refiere a la bacteria principal del grupo, *Escherichia coli*. El grupo coliforme se define como todas las bacterias Gram negativas en forma bacilar que fermentan la lactosa a temperaturas de 35 a 37 °C, produciendo ácido y gas (CO<sub>2</sub>) en 24 horas, aerobias o anaerobias facultativas, son oxidasa negativa, no forman esporas y presentan actividad enzimática de la β-galactosidasa. Entre ellos se encuentran *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella* (Carillo & Lozano, 2008).

Los coliformes fecales, también denominados coliformes termotolerantes, son un subgrupo de los coliformes totales, llamados así porque soportan temperaturas hasta de 45 °C; comprenden un grupo muy reducido de microorganismos que son indicadores de calidad, ya que son de origen fecal. En su mayoría están representados por *E. coli*, pero se pueden encontrar, entre otros menos frecuentes, *Citrobacter freundii* y *Klebsiella pneumoniae*; estos últimos hacen parte

de los coliformes termotolerantes, pero su origen se asocia normalmente con la vegetación y solo ocasionalmente aparecen en el intestino (Carillo & Lozano, 2008).

La capacidad de reproducción de los coliformes fecales fuera del intestino de los animales homeotérmicos es favorecida por la existencia de condiciones adecuadas de materia orgánica, pH, humedad, etc. Algunos géneros son autóctonos de aguas con residuos vegetales, como hojas en descomposición. También pueden reproducirse en las biopelículas que se forman en las tuberías de distribución de agua potable. Por estas razones y por la existencia de bacterias que responden a la definición de coliformes que no son de origen fecal y que incluso pueden ser lactosa-negativas (apareciendo como positivas si se aplica la prueba de  $\beta$ -galactosidasa), el grupo de los coliformes totales tiene actualmente poca utilidad como indicador de contaminación fecal (Ramos-Ortega, Vidal, Vilardy, & Saavedra-Díaz, 2008).

### **2.2.3. *Escherichia coli***

Desde el punto de vista taxonómico la clasificación de *Escherichia coli* es la siguiente: Phylum: *Proteobacteria*, Clase: *Gammaproteobacteria*, Orden: *Enterobacteriales*, Familia: *Enterobacteriaceae*, Género: *Escherichia*, Especie: *Escherichia coli* (Scheutz & Strockbine, 2005)

La bacteria *Escherichia coli* fue inicialmente aislada y descrita por el pediatra alemán Escherich en 1885, quien demostró su existencia como huésped habitual del intestino. La denominó *Bacterium coli commune*, que puede traducirse como “bacteria común del colon”. Fue en 1919 cuando Castellani y Chalmers le dieron su denominación definitiva en homenaje a Escherich. *Escherichia* se convirtió rápidamente en el género tipo de la familia de las *Enterobacteriaceas* y *E. coli* en la especie más conocida de este género (Canet, 2016).

*E. coli* se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por flagelos peritricos, cuyo hábitat es el intestino de animales de sangre caliente. Por otro lado, el pH y la actividad de agua pueden influir en la proliferación de esta bacteria; las



condiciones óptimas de desarrollo para estos parámetros son de 7,2 y 0,99 respectivamente. El desarrollo de *E. coli* se detiene a pH inferior a 3,8 y superiores a 9,5; y a valores de actividad de agua inferiores a 0,94 (Benvenuto, 2017). Esta bacteria es utilizada como indicador de posible contaminación fecal y presencia de patógenos en agua y alimentos debido a que se encuentra abundantemente en heces de humanos y animales (Soto, Pérez, & Estrada, 2016)

Esta bacteria es un bacilo que puede llegar a medir entre uno hasta 3  $\mu\text{m}$  de diámetro mayor y posee capacidad de movimiento a través de flagelos peritricos (antígeno H); los flagelos son estructuras filiformes que pueden medir varios micrómetros. También posee fimbrias (antígeno F) que son estructuras más pequeñas que, a diferencia de los flagelos, no tienen movilidad, pero por ser de naturaleza proteica, posee propiedades antigénicas y hemoaglutinantes. Asimismo, posee una pared celular (antígeno O) que contiene peptidoglucano; esta pared es altamente antigénica y con capacidad de endotoxina. Finalmente, *Escherichia coli* posee una cápsula (antígeno K) que le otorga protección contra la fagocitosis y la acción inmunitaria primaria (Benvenuto, 2017). Se han identificado por lo menos seis categorías de *E. coli* que provocan diarreas en el humano. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), adherente difusa (DAEC) y enteropatógena (EPEC). Cada una de ellas tiene codificado a nivel cromosomal y plasmídico diferentes grupos de genes que participan directamente en la virulencia (Vidal, 2003).

#### **2.2.4. Antibióticos del perfil de resistencia**

La ampicilina es una penicilina semisintética derivada del núcleo 6- aminopenicilánico, de acción bactericida. Actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana y posee un amplio espectro antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas, Gram negativas y anaerobios. Asimismo, la cefotaxima es una cefalosporina de amplio espectro, de tercera generación, que es altamente resistente a muchas de las betalactamasas bacterianas, pero no a las de espectro extendido y tiene buena actividad frente a bacterias aerobias Gram positivas y Gram negativas

(Morón & Levy, 2002; Maguiña-Vargas, Ugarte-Gil, & Montiel, 2006; Quizhpe, y otros, 2014; Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015).

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido de administración parenteral, tópica y uso oftálmico que tiene efecto concentración dependiente, efecto postantibiótico prolongado y acción sinérgica con antibióticos betalactámicos; posee un espectro antimicrobiano principalmente frente a bacterias Gram negativas y tiene actividad frente a ciertas bacterias Gram positivas. En cambio, la amikacina es un antibiótico aminoglucósido semisintético derivado de la kanamicina con formulación exclusivamente parenteral y uso hospitalario, con un espectro antimicrobiano frente a bacterias Gram negativas y con alguna cobertura de bacterias Gram positivas y actúa mediante la interferencia de la síntesis proteica bacteriana (Morón & Levy, 2002; Maguiña-Vargas, Ugarte-Gil, & Montiel, 2006; Quizhpe, y otros, 2014; Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015).

De otro lado, el ciprofloxacino es un antibiótico del grupo de las fluoroquinolonas que inhibe la síntesis del DNA bacteriano; es un bactericida, con un espectro antimicrobiano que incluye bacilos Gram negativos entéricos y *Pseudomonas aeruginosa*; tiene escasa actividad frente a patógenos Gram positivos y anaerobios. En cambio, el sulfametoprim es una asociación de sulfametoxazol y trimetoprima que interfiere en la síntesis bacteriana del ácido tetrahidrofólico, elemento fundamental en la producción de timidina, purinas y, posteriormente, de ácidos nucleicos. El sulfametoxazol (SMZ), al igual que otras sulfonamidas, inhibe la síntesis del ácido dihidrofólico a partir del ácido *p*-aminobenzoico; el trimetoprim (TMP) inhibe la enzima reductasa de dihidrofolato y evita la síntesis del ácido tetrahidrofólico a partir del ácido dihidrofólico. La acción combinada de ambas sustancias da lugar a un incremento del efecto bacteriostático y bactericida, que es óptimo y muy amplio cuando guarda una proporción de 1:20 (TMP:SMZ) (Morón & Levy, 2002; Maguiña-Vargas, Ugarte-Gil, & Montiel, 2006; Quizhpe, y otros, 2014; Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015).

### 2.2.5. Antibióticos para la determinación de betalactamasas

Amoxicilina y ácido clavulánico es una asociación de una penicilina semisintética, amoxicilina (bactericida, amplio espectro), y de una molécula inhibidora de  $\beta$ -lactamasas (ácido clavulánico) que transforma en sensibles a la amoxicilina a gérmenes productores de  $\beta$ -lactamasas. Aztreonam, es un antibiótico del grupo de los monobactámicos que muestra una actividad potente y específica *in vitro* frente a un amplio espectro de patógenos aerobios Gram negativos incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. La acción bactericida de aztreonam se produce por la inhibición de la síntesis de la pared de la célula bacteriana (Morón & Levy, 2002; Maguiña-Vargas, Ugarte-Gil, & Montiel, 2006; Quizhpe, y otros, 2014; Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015).

Cefepime es un antibiótico de cefalosporina de cuarta generación, de administración parenteral, con un espectro antimicrobiano para bacterias Gram negativas más amplio que las cefalosporinas de tercera generación y mejor actividad que ceftazidima frente a bacterias Gram positivas. Tiene actividad frente a la mayoría de gérmenes productores de betalactamasas y carece de actividad frente a anaerobios. Generalmente utilizado como alternativa de segunda elección en infecciones por gérmenes resistentes a cefalosporinas de tercera generación. Ceftazidima es una cefalosporina de amplio espectro, de tercera generación; su actividad frente a microorganismos Gram positivos es hasta un 50 % inferior a cefotaxima y es similar frente a las enterobacterias Gram negativas. No obstante, su característica más destacada es la buena actividad frente a *Pseudomonas*, lo que explica su denominación de cefalosporina antipseudomona. Ceftriaxona es una cefalosporina de tercera generación exclusivamente parenteral, con un espectro antimicrobiano similar a cefotaxima. Su espectro de actividad basado en bacterias aerobias Gram negativas, con mayor actividad que las cefalosporinas de segunda generación frente algunas de estas bacterias, y en cocos Gram positivos (Morón & Levy, 2002; Maguiña-Vargas, Ugarte-Gil, & Montiel, 2006; Quizhpe, y otros, 2014; Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría, 2015).

### **2.2.6. Resistencia bacteriana a antibióticos**

La resistencia bacteriana puede definirse como la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis terapéuticas. Desde que en 1928 el bacteriólogo británico Alexander Fleming descubriera la penicilina hasta la época actual, el desarrollo de la antibioterapia ha permitido cambiar el curso del tratamiento de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el uso de antibióticos se ha extendido sobremanera tanto en el campo de la medicina humana como en veterinaria y agricultura, lo cual ha traído consigo nuevas dificultades en la lucha frente a las infecciones, las resistencias bacterianas (García, y otros, 2011; Quizhpe, y otros, 2014).

Las bacterias pueden tener una resistencia natural o intrínseca a algunas familias de antibióticos, la misma que ya está presente antes de que la bacteria se exponga al uso del agente terapéutico. Esta resistencia es dependiente de la variabilidad genética que sufre la bacteria en su evolución. Este hecho ha podido ser comprobado al exponer a antibióticos cepas de bacterias halladas en las profundidades de los glaciares en las regiones árticas de Canadá, con más de dos mil años de antigüedad, y fueron resistentes a antimicrobianos. Por tanto, como hay 19 siglos precedentes al desarrollo de los antibióticos por el ser humano, estas bacterias ya traían una resistencia intrínseca (Fernández, López, Ponce, & Machado, 2003).

De otro lado, la resistencia a un antibiótico puede ser adquirida por la bacteria. Esta se genera por mecanismos tales como pequeñas mutaciones (mutaciones puntiformes, a veces únicas), o grandes mutaciones (transposición o translocación de grandes cadenas) de su material genético. Otro mecanismo por el cual la bacteria puede adquirir resistencia es mediante la adquisición o transmisión de genes de la resistencia intraespecies o interespecies. Este intercambio de información de material genético usualmente extra cromosómico se realiza mediante vehículos que trasladan el material de bacteria a bacteria, llámese integrones, bacteriófagos o transposones. Por ello una bacteria es capaz de adquirir la resistencia a un antibiótico sin necesidad de haber estado en contacto con éstos (Echevarría & Iglesias, 2003).

Es decir, la resistencia antibiótica es un fenómeno biológico natural debido a las mutaciones y a la gran capacidad de las bacterias de transferir horizontalmente su material genético, existiendo una clara correlación entre el uso de antibióticos y la resistencia bacteriana. Se constituye así en un problema a nivel mundial que supone mayor morbilidad, pérdida en la productividad y mortalidad. La relación antibiótico-bacteria se ve alterada por otros múltiples factores como la farmacocinética de la droga, la dosis, la duración del tratamiento, el tamaño de inóculo bacteriano, etc.; por lo que, para optimizar el uso de estos fármacos, se realizan supervisiones periódicas de la resistencia como parte transcendental de la política de control de la resistencia antibiótica (Mosquito, Ruiz, Bauer, & Ochoa, 2011).

La frecuencia y nivel de resistencia de bacteria a un antibiótico varía con relación a una serie de factores. La resistencia puede variar en el tiempo y va a ser diferente en diversas áreas geográficas, dependiendo de si la bacteria reside en la comunidad o en un centro de atención de salud y, dentro del mismo, el nivel de resistencia va a variar según el nivel de complejidad de la unidad hospitalaria. Se ha determinado que existe una serie de factores de la práctica médica diaria, tales como la frecuencia en el uso de antibióticos en el sistema, uso racional de los mismos y la variación genética espontánea e inducida por la presión selectiva de los antibióticos sobre determinados gérmenes (Sanders & Sanders, 1992).

#### **2.2.7. *Escherichia coli* productoras de BLEE**

Dentro de los mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos destaca el de la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), cuya aparición en los años ochenta se atribuyó al uso masivo de cefalosporinas de amplio espectro y aztreonam. Las BLEE son una familia de enzimas producidas mayormente por bacilos gramnegativos, que en su mayoría derivan de las betalactamasas clásicas TEM y SHV a partir de una serie de mutaciones puntuales que afectan a su centro activo. Se han descrito fundamentalmente en cepas de *E. coli*, *Klebsiella spp.*

y *Enterobacter spp*, aunque también en microorganismos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* (García, y otros, 2011).

Las  $\beta$ -lactamasas son enzimas que hidrolizan el enlace amida del anillo  $\beta$ -lactama de penicilinas, cefalosporinas y otros  $\beta$ -lactámicos, dando lugar a compuestos sin actividad antibacteriana. Estas enzimas constituyen, en la actualidad, el principal determinante de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos de la mayoría de las bacterias patógenas (Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009).

Estas enzimas confieren resistencia a un gran número de antibióticos de uso común como penicilina, ampicilina, cefalosporinas de cualquier generación (excepto cefamicinas), aztreonam y, en un porcentaje no desdeñable de casos, también a los betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas, aminoglucósidos, tetraciclinas y cotrimoxazol. Este patrón de multiresistencia supone una dificultad terapéutica que explica su asociación en numerosos estudios con mayor mortalidad, duración de la estancia hospitalaria y coste económico. Si a ello se asocia la tendencia restrictiva en cuanto al número de nuevas moléculas de antibiótico aprobadas por la FDA de los Estados Unidos de América en los últimos años, se puede vislumbrar cuán importante es evitar la aparición de resistencias (García, y otros, 2011).

Al final de la década de 1990, se optimizó la administración oral de antibióticos mediante el perfeccionamiento de diferentes mecanismos médicos y se crearon los llamados fármacos “de diseño” (asociación amoxicilina/clavulánico). El ácido clavulánico tiene un núcleo similar al de las penicilinas con la sustitución del átomo de azufre por un átomo de oxígeno, lo que incrementa la reactividad de la molécula y proporciona una afinidad mayor por las betalactamasas (Llenque-Díaz & Acevedo-Hurtado, 2012).

Un problema es que la resistencia mediada por BLEE se asocia a una mayor mortalidad. En un estudio retrospectivo en el Hospital Cayetano Heredia entre los años 2006 y 2008 en pacientes con bacteriemia, la mortalidad en los pacientes con cepas productoras de BLEE fue de 63%. Lo impactante de este trabajo es que los pacientes provenían de la comunidad en el 53% de



los casos, siendo el foco más común el urinario. Esto, sin duda, habla de que es imprescindible sospechar la posibilidad de bacterias productoras de BLEE, especialmente en casos de infecciones urinarias, por cuanto un tratamiento empírico inadecuado se va a asociar a una mayor mortalidad (Fernández L. , 2017).

#### **2.2.8. El río Piura**

El departamento de Piura tiene una superficie de 35 892,49 km<sup>2</sup>, está ubicado en la parte noroccidental del país, entre la latitud Sur 4°04'50" y 6°22'10" y longitud Oeste 79°13'15" y 81°19'35" y constituye el 3,1% del territorio peruano. Se encuentra conformado políticamente por ocho provincias y 65 distritos; limita por el norte con Tumbes y la República del Ecuador; por el este con Cajamarca y el Ecuador; por el sur con Lambayeque; y, por el oeste con el Océano Pacífico (Progobernabilidad, s/a).

La cuenca del río Piura tiene 12,216 km<sup>2</sup> de superficie, en la cual tienen parte cinco provincias: Piura, Morropón, Sechura, Ayabaca y Huancabamba. El río Piura abarca principalmente zonas de alta actividad agrícola y lo bordean sabanas de árboles leñosos, entre las especies de flora más representativas tenemos el algarrobo (*Prosopis pallida*), faique (*Acacia macracantha*), pájaro bobo (*Tessaria integrifolia*) y overo (*Cordia lutea*) árboles que se desarrollan en las sabanas costeras, además de especies que se desarrollan en la ribera del río como carricillo (*Phragmites australis*); entre la flora exótica asociada al río Piura se encuentra en la ribera del río la higuera (*Ricinus communis*), cardosanto (*Argemone mexicana*) y nim (*Azadirachta indica*) (Autoridad Nacional del Agua, 2015).

La fauna más representativa asociada al río Piura en la zona agrícola presenta aves como la luisa (*Thraupis episcopus*), la tórtola (*Columbina cruziana*) y el picaflor (*Amazilia amazilia*); en la ribera del río se encuentran aves migratorias como la garza real (*Ardea cinerea*), garza bruja (*Nycticorax nycticorax*) y el cormorán neotropical (*Phalacrocorax brasilianus*). Respecto a la fauna acuática presente en el río Piura, específicamente peces, se observó actividad de pesca

artesanal, los pobladores locales pescan las comúnmente llamadas tilapia (*Oreochromis sp.*) y lisa (*Mugil cephalus*) en su mayoría para consumo personal (Autoridad Nacional del Agua, 2015).

La población aledaña a la cuenca es de composición heterogénea y de un grado cultural medio, destacando en todos los niveles los agricultores y comerciantes. Sin embargo, se puede diferenciar claramente los grupos que caracterizan a cada nivel de la cuenca; así tenemos que, en la parte alta se encuentran los productores de cañazo y los criadores y vendedores de ganado. En la parte media destacan los ceramistas, productores agrícolas y apícolas. En la parte baja de la cuenca un buen grupo de la población son agricultores, artesanos, ceramistas y pescadores (Instituto Regional de apoyo a la gestión de los recursos hídricos, s/a).

Los usos del agua de la cuenca del río Piura están orientados principalmente a la producción agrícola. Los cultivos principales, como algodón, maíz, arroz, hortalizas y forrajes, consumen 551,668 MMC/ año de agua. Así mismo, sólo se menciona para usos pecuarios un volumen de 2,9 MMC/ año y para usos industriales, de 1,2 MMC/ año para las cuencas del Chira y Piura. Con respecto a uso minero en la cuenca del río Piura se registra un consumo de 0.57 MMC/año (Instituto Regional de apoyo a la gestión de los recursos hídricos, s/a).

A nivel de Piura no existen diagnósticos integrales sobre la calidad del agua; sólo se tienen estudios parciales que, en términos generales, dan una idea de la situación en algunos tramos del río Piura, a pesar de la importancia que representa este factor para la salud de la población. Las aguas residuales de la ciudad son vertidas al río Piura en un volumen anual de 10 MMC; ello estaría afectando la calidad del agua que se usa para el consumo humano y agrícola en el Bajo Piura. La Empresa Prestadora de Servicios Grau (EPS Grau) informa que en la cuenca se tienen 26 lagunas de oxidación, las cuales tratan 886 220 m<sup>3</sup>/mes, y son vertidos sin tratamiento 314 367 m<sup>3</sup>/mes equivalente al 26,2 % de las aguas residuales de Piura, Castilla, Catacaos, Chulucanas y Morropón (Instituto Regional de apoyo a la gestión de los recursos hídricos, s/a).

### 2.3. GLOSARIO DE TÉRMINOS BÁSIC

- Antiséptico: Sustancia química que destruye o inhibe el crecimiento de bacterias patógenas y otros microorganismos; por ser muy poco tóxica puede aplicarse sobre la piel o las membranas mucosas en la cura de heridas y en la prevención de infecciones.
- Bactericida: Es una sustancia que tiene la capacidad de matar bacterias.
- Bacteriostático: Agente que inhibe el crecimiento de las bacterias sin causarle necesariamente la muerte.
- Bioinformática: Es la aplicación de tecnologías computacionales y la estadística a la gestión de análisis de datos biológicos.
- Colicinas: Sustancias que matan a posibles competidores de la misma especie.
- Desinfectante: Agente que destruye o elimina las bacterias y otros microorganismos y se utiliza para limpiar el instrumental quirúrgico y otros objetos.
- Frecuencia: Es una magnitud que mide el número de repeticiones por unidad de tiempo de cualquier fenómeno o suceso periódico.
- Genómica: Es una rama de la Genética que se ocupa del mapeo, secuenciación y análisis de las funciones de genomas completos.
- Infección nosocomial: Es una infección contraída durante una estancia en un centro de salud. Una infección se considera nosocomial si aparece al menos 48 horas después de entrar en las instalaciones de salud.
- MMC: millones de metros cúbicos.
- Morbilidad: Estado de enfermedad.
- Portador: Es una persona que lleva y es capaz de transmitir una mutación genética asociada a una enfermedad, y puede o no puede mostrar síntomas de la enfermedad.
- Proteómica: Proporciona un conjunto de herramientas muy poderosas para el estudio a gran escala de la función de los genes a nivel de proteína.
- Sinergia: Acción conjunta de varios órganos en la realización de una función.

- Suspensión: Es una mezcla heterogénea formada por un sólido en polvo o por pequeñas partículas no solubles (fase dispersa) que se dispersan en un medio líquido (fase dispersante o dispersora).

## **2.4. HIPÓTESIS**

Existen cepas de *Escherichia coli* resistente a antibióticos en aguas del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú.

## **CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1. ENFOQUE Y DISEÑO**

Enfoque: Cuantitativo.

Diseño: No experimental.

Nivel: Descriptivo.

Tipo: Básico.

### **3.2. SUJETOS DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.2.1. Población**

Las bacterias *E. coli* de las aguas del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, entre agosto de 2018 y enero de 2019.

#### **3.2.2. Muestra**

Las bacterias *E. coli* contenidas en 120 frascos de 250 ml tomados en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, entre agosto de 2018 y enero de 2019.

### **3.3. MÉTODOS Y PROCEDIMIENTOS**

#### **3.3.1. Recolección de muestras**

Durante los meses de agosto 2018 a enero de 2019 se recolectaron 120 muestras de agua de los puntos de muestreo definidos a lo largo de un tramo del río Piura comprendido dentro de la ciudad; el primer punto de muestreo, se encuentra frente al lugar denominado ex Toyota, el segundo punto de muestreo, está ubicado a la altura del centro comercial divermotor, tercer punto de muestreo, se encuentra a la altura de la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Nacional de Piura (Fig. 1, Anexos); tales puntos, se encontraron separados por 1000 m de distancia. Se tomaron en cuenta datos como pH, temperatura del agua, temperatura del aire y la

hora de toma de muestra. Las muestras de agua se recolectaron en frascos transparentes de vidrio estéril, de boca ancha, con tapa rosca y con capacidad de 250 ml; los frascos se rotularon de acuerdo al número del punto; seguido de ello, las muestras fueron transportadas en una caja conservadora con geles refrigerantes para mantener la temperatura de 4 °C hasta la llegada al laboratorio para los análisis respectivos, tal como lo recomienda el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 2000.

### **3.3.2. Aislamiento e identificación de *Escherichia coli***

Cada muestra recolectada fue diluida con agua destilada esterilizada a los niveles  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ , inoculada en placas de agar Mc Conkey e incubada a 37°C por 24 horas; luego, se seleccionaron las colonias típicas lactosa-positivas, las cuales se aislaron en tubos con agar Müeller-Hinton inclinado y se incubaron a 37° por 24 horas; a éstas se les realizó la coloración de Gram para comprobar la pureza de la cepa y luego proceder con las pruebas de identificación y de susceptibilidad a los antibióticos.

La determinación de las cepas de *Escherichia coli* se realizó por métodos bioquímicos.

#### **3.3.2.1. Prueba de oxidasa:**

Esta prueba es de las primeras que se realiza, pues sirve de tamizaje, debido a que *E. coli* y las enterobacterias son oxidasa-negativas, excepto *Plesiomonas shigelloides*. Para la realización de esta prueba se utilizó tiras reactivas con el reactivo dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio; se tomó del medio de cultivo una parte de la colonia investigada y se aplicó sobre la zona reactiva; al cabo de 20 segundos se comparó con la escala colorimétrica del envase. Un resultado positivo origina un color azul violeta. Un resultado negativo generalmente origina un color amarillo muy tenue. *E. coli* es oxidasa negativa.



### 3.3.2.2. Prueba en agar hierro y triple azúcar (Triple Sugar Iron Agar):

El agar TSI se usa para determinar si una bacteria metaboliza la glucosa, lactosa o sacarosa de manera fermentativa, forma sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y gas. Con un asa recta se tocó la parte superior de una colonia bien aislada y se sembró en el tubo con agar TSI primero por punción a través del centro del medio hasta el fondo del tubo y después por formación de estrías en la superficie del agar inclinado; se incubó el tubo a 35° C durante 18 a 24 horas. Los resultados pueden leerse según los siguientes criterios:

- Agar inclinado alcalino/sin cambios en el fondo: no utiliza glucosa, lactosa y sacarosa.
- Agar inclinado alcalino/fondo ácido: fermentación de la glucosa solamente.
- Agar inclinado ácido/fondo ácido: fermentador de glucosa, sacarosa o lactosa.

*E. coli* fermenta glucosa, sacarosa y lactosa, produce gas, acidificando el medio que se torna amarillo. No forma ácido sulfhídrico.

### 3.3.2.3. Prueba de descarboxilasa (Agar lisina hierro):

En este medio de cultivo la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y desaminasa. Las muestras se sembraron mediante estría en la superficie inclinada y una picadura vertical y profunda en el centro del tubo; luego, se incubaron por 24 a 48

horas a 37°C. La descarboxilación de la lisina o prueba positiva se demuestra por pico violeta/fondo violeta; la prueba negativa, por pico violeta/fondo amarillo. *E. coli* descarboxila la lisina, formando por tanto un pico violeta y un fondo violeta.

#### 3.3.2.4. Prueba de citrato (agar citrato de Simmons):

La energía puede ser obtenida por algunas bacterias, en ausencia de fermentación o producción de ácido láctico, por la utilización del citrato como única fuente de carbono. Los tubos con agar inclinado (pico de flauta) citrato de Simmons, se inocularon y estriaron en el pico de flauta por estriación escasa; luego, se incubaron a 37° por 24 horas. La prueba es positiva cuando hay crecimiento con un intenso color azul en el pico de flauta; es negativa cuando hay ausencia de crecimiento y ningún cambio de color. *E. coli* es citrato-negativa, lo que se demuestra porque no hay cambio de color en el medio.

#### 3.3.2.5. Prueba de movilidad (Medio SIM):

En este medio de cultivo la tripteína y la peptona aportan nutrientes para el desarrollo microbiano. El triptófano es un aminoácido constituyente de muchas peptonas y particularmente de la tripteína y puede ser metabolizado por algunas bacterias para formar indol. Se sembró con aguja, en profundidad y en el centro del tubo, se incubó a 37° C por 18-24 horas. La movilidad positiva se observa con un crecimiento y turbidez que abarca más allá de la línea de siembra. La movilidad negativa se demuestra con un crecimiento sólo en la línea de siembra y el resto de la superficie se observa limpia. La producción de SH<sub>2</sub> es positiva cuando hay ennegrecimiento del medio. Es negativa, cuando no se observa

cambio de color en el medio de cultivo. Para demostrar la producción de indol se agregan tres a cinco gotas del reactivo de Kovacs. La prueba es positiva cuando la parte superior del tubo cambia a rojo; es negativa si no se observa color rojo. *E. coli* es móvil, indol positivo y H<sub>2</sub>S negativo.

#### 3.3.2.6. Prueba de rojo de metilo (Medio MR-VP):

La prueba de rojo de metilo es una prueba cuantitativa basada en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, para determinar la concentración de ion hidrógeno (pH) cuando un microorganismo fermenta la glucosa. Los tubos con medio MR-VP fueron inoculados e incubados a 37° durante tres días, luego de ese período se les agregó dos gotas del indicador rojo de metilo y de forma inmediata se interpretó el color del resultado. MR (+), el cultivo es suficientemente ácido (pH 4,4) para permitir que el reactivo rojo de metilo permanezca con un color distintivo rojo brillante; MR (-), color amarillo (pH 6). *E. coli* es rojo de metilo-positiva.

#### 3.3.2.7. Prueba Voges-Proskauer (Medio MR-VP):

La prueba de Voges-Proskauer (VP) se basa en la detección de acetoína, un producto final neutro derivado del metabolismo de la glucosa. Los tubos con medio MR-VP fueron inoculados e incubados a 37° durante 48 horas a más; luego de este período se les agregó seis gotas del reactivo A y dos gotas del reactivo B; los tubos se agitaron y dejaron reposar entre 10 a 15 min. Las pruebas VP positivas se observan de color rojo cereza en la superficie del medio; las VP negativas, de color amarillo en la superficie del medio. Las cepas de *E. coli* son VP negativas.

#### 3.3.2.8. Fermentación de carbohidratos:

La fermentación es un proceso metabólico anaerobio de oxidación – reducción, en el cual un sustrato orgánico actúa como el aceptor final de hidrógeno (aceptor de electrones) en lugar de oxígeno. Para obtener el caldo básico de fermentación con rojo de fenol se preparó el caldo nutritivo como indicaba el rótulo del medio; se agregó 0,018 gr de rojo de fenol por litro de medio; luego, se homogenizó y se añadió el azúcar a la base en la concentración deseada, se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 min y se dejó enfriar. De un crecimiento de cultivo puro menor a 24 horas se inoculó a la batería de hidratos de carbono, se incubó a 37° C, de 18 a 24 hrs. La batería de azúcares probados fueron lactosa, sacarosa, manitol, maltosa y arabinosa. El resultado positivo para la fermentación, o sea, ácido fue la observación de un color amarillo; un resultado tardío mostraba un color anaranjado (se comparó con un tubo no inoculado y se reincubó); y, un resultado negativo presentaba un color rosa rojizo. *E. coli* tiene un metabolismo fermentativo para los azúcares probados, excepto sacarosa, que es variable.

#### 3.3.3. Pruebas de susceptibilidad a antibióticos

Para realizar las pruebas de susceptibilidad se utilizó los discos de sensibilidad de ampicilina (AM) 10 µg, amikacina (AK) 30 µg, cefotaxima (CTX) 30 µg, ciprofloxacina (CIP) 5 µg, gentamicina (CN) 10 µg y trimetoprim sulfametoxazol (STX) 25 µg (Sacsquispe & Velásquez, 2002)

Las pruebas de susceptibilidad de difusión en placa se realizaron a partir de cultivos de 24 horas; se preparó una suspensión con solución salina fisiológica esterilizada para ajustar la

concentración de microorganismos al tubo 0,5 de la escala de McFarland, que es equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

En un lapso no mayor de 15 minutos se sumergió un hisopo estéril en la suspensión anterior, se giró la terminal de algodón del hisopo en las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido.

Luego, se distribuyó la suspensión bacteriana uniformemente en la superficie de una placa de Petri con agar Müller-Hinton, se dejó secar el exceso de humedad por 10 minutos, se colocaron los discos de antibióticos antes mencionados distribuyéndolos simétricamente y se incubaron las placas así sembradas a 35°C por 18 a 24 horas en estufa.

Los microorganismos fueron clasificados como sensibles o resistentes al antibiótico de acuerdo al diámetro de la zona de inhibición alrededor del disco y los estándares de interpretación del CLSI (Tabla 3.3.3.1) (Sacaquispe & Velásquez, 2002). La medición de los halos se realizó con un vernier digital electrónico.

**Tabla 3.3.3.1. Halos de inhibición de la sensibilidad antibiótica según el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de enero del 2018 27th ed. para *E. coli*.**

Antibiótico	Sigla	Resistente	Susceptible
Ampicilina	AM	$\leq 13$ mm	$\geq 17$ mm
Amikacina	AK	$\leq 14$ mm	$\geq 17$ mm
Cefotaxima	CTX	$\leq 22$ mm	$\geq 26$ mm
Ciprofloxacina	CIP	$\leq 15$ mm	$\geq 21$ mm
Gentamicina	CN	$\leq 12$ mm	$\geq 15$ mm
Sulfametoprim	SXT	$\leq 10$ mm	$\geq 16$ mm

Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI,2018).

### 3.3.4. Pruebas de tamizaje para cepas productoras de BLEE

Todas las cepas de *E. coli* se sometieron a la prueba de tamizaje de doble disco para la determinación de productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). A partir del cultivo puro se preparó una suspensión de bacterias con solución salina esterilizada ajustada al tubo 0,5 de la escala de McFarland, que es equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml.

Se sembró en agar Müeller-Hinton mediante la técnica de Kirby-Bauer; se usaron discos de sensibilidad, según las recomendaciones del CLSI, de aztreonam (AZ) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg), ceftazidima (CAZ) (30 µg) y ceftriaxona (CTR) (30 µg) y se incubaron a 37° por 24 h. Se consideraron cepas sospechosas de producir β-lactamasas de espectro extendido cuando la cepa presentó para al menos uno de los antibióticos halos de inhibición iguales o inferiores a los diámetros recomendados por el CLSI. La medición de los halos se realizó con un vernier digital electrónico.

**Tabla 3.3.4.1. Halos de inhibición según el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de enero del 2018 27th ed. para seleccionar las cepas probables productoras de β-lactamasas de espectro extendido.**

Antibiótico	Sigla	Resistente	Susceptible
Aztreonam	AZ	≤ 17 mm	≥ 21 mm
Cefotaxima	CTX	≤ 22 mm	≥ 26 mm
Ceftazidima	CAZ	≤ 17 mm	≥ 21 mm
Ceftriaxona	CTR	≤ 19 mm	≥ 23 mm

Fuente: *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI,2018).

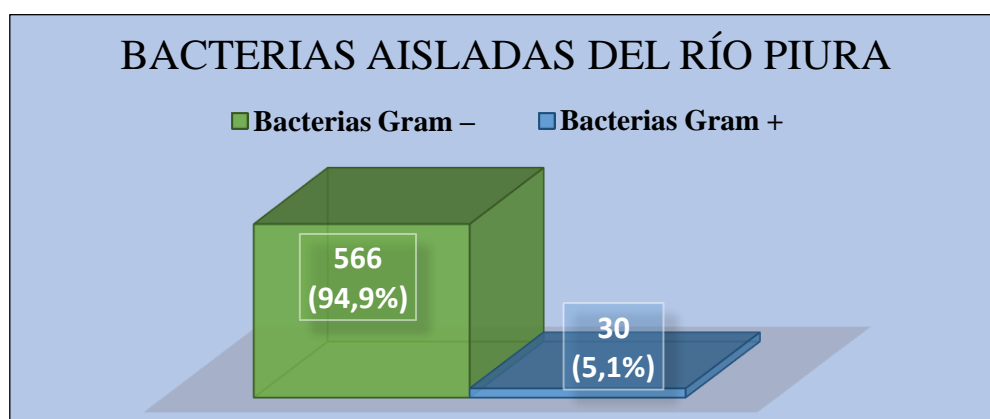
### **3.3.5. Prueba confirmatoria para cepas productoras de BLEE**

Luego se realizó la prueba confirmatoria para BLEE, que se desarrolló por el método de Jarlier. Al igual que en el procedimiento anterior, en una placa de agar Müller- Hinton se inoculó las cepas de *E. coli* sospechosas con una suspensión bacteriana equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland. Sobre ella se colocaron los discos de susceptibilidad de ceftazidima (CAZ) (30 µg), cefepime (CPM) (30 µg), cefotaxima (CTX) (30 µg) y aztreonam (AZ) (30 µg), a 25 mm del centro, en donde estuvo un disco de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC) (20/10 µg). Se incubó a 37°C por 18-24 h. Esto da como resultado el efecto sinérgico entre el inhibidor y los discos de antimicrobianos, conocido como efecto de huevo, cola de pez, o balón de futbol americano (Lezameta, Gonzáles-Escalante, & Tamariz, 2010).

## CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

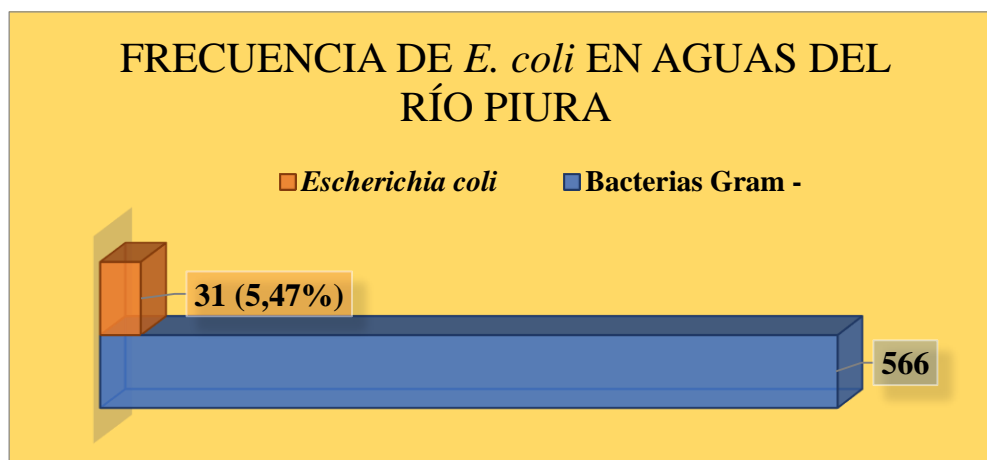
### 4.1. RESULTADOS

En total, se obtuvieron 596 cepas de bacterias en aguas del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú, entre agosto de 2018 y enero de 2019, de las cuales 566 (94,9 %) fueron Gram negativas y 30 (5,1 %), Gram positivas (Gráfico 4.1).



**Gráfico 4.1. Porcentajes de bacterias Gram negativas y Gram positivas aisladas del agua del río Piura.**

Del mismo modo, se aislaron 31 cepas (5,47%) de *Escherichia coli* de 566 aislamientos correspondientes a bacilos Gram negativos (Gráfico 4.2) en aguas del río Piura, en un tramo cuando atraviesa la ciudad, durante el periodo de agosto de 2018 a enero de 2019.



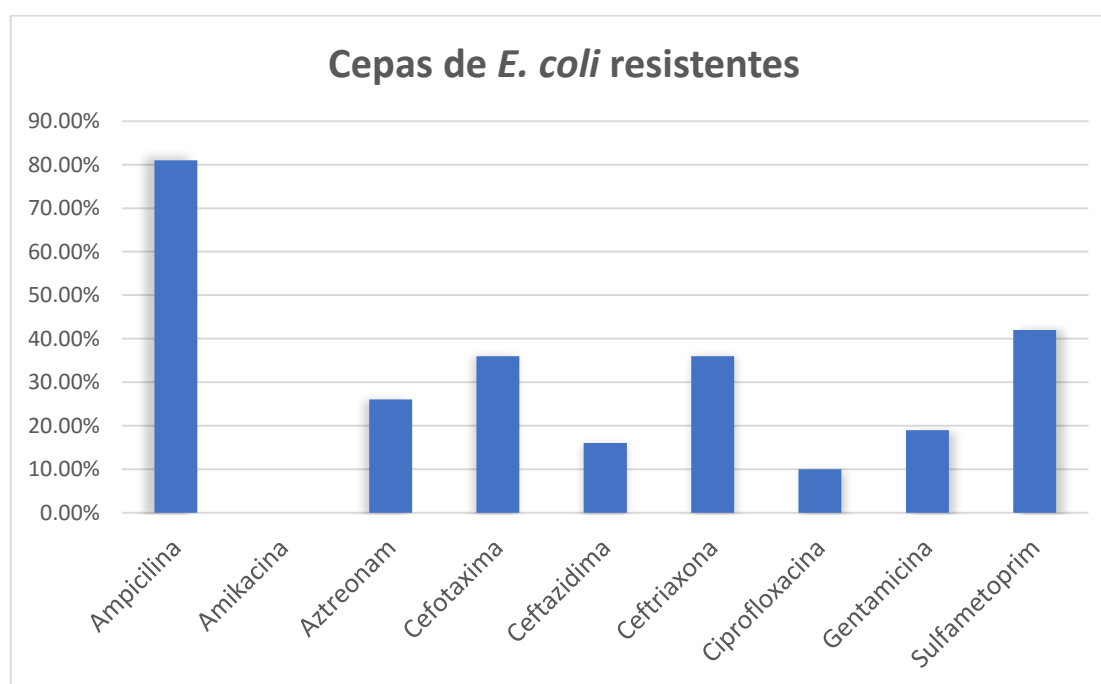
**Gráfico 4.2. Frecuencia de *E. coli* aisladas del agua del río Piura.**



En cuanto a la resistencia a los antibióticos, de las 31 cepas de *E. coli* aisladas se encontró que hubo más aislamientos resistentes a ampicilina (80,6%), mientras que ninguno fue resistente a amikacina (Tabla 4.1, Gráfico 4.3).

**Tabla 4.1. Cepas resistentes a antibióticos en aislamientos de *E. coli*.**

Antibiótico	Cepas de <i>E. coli</i> resistentes (N)	Cepas de <i>E. coli</i> resistentes (%)
<b>Ampicilina</b>	25/31	80,6
<b>Amikacina</b>	0/31	0,0
<b>Aztreonam</b>	8/31	25,8
<b>Cefotaxima</b>	11/31	35,5
<b>Ceftazidima</b>	5/31	16,1
<b>Ceftriaxona</b>	11/31	35,5
<b>Ciprofloxacina</b>	3/31	9,7
<b>Gentamicina</b>	6/31	19,4
<b>Sulfametoprim</b>	13/31	41,9

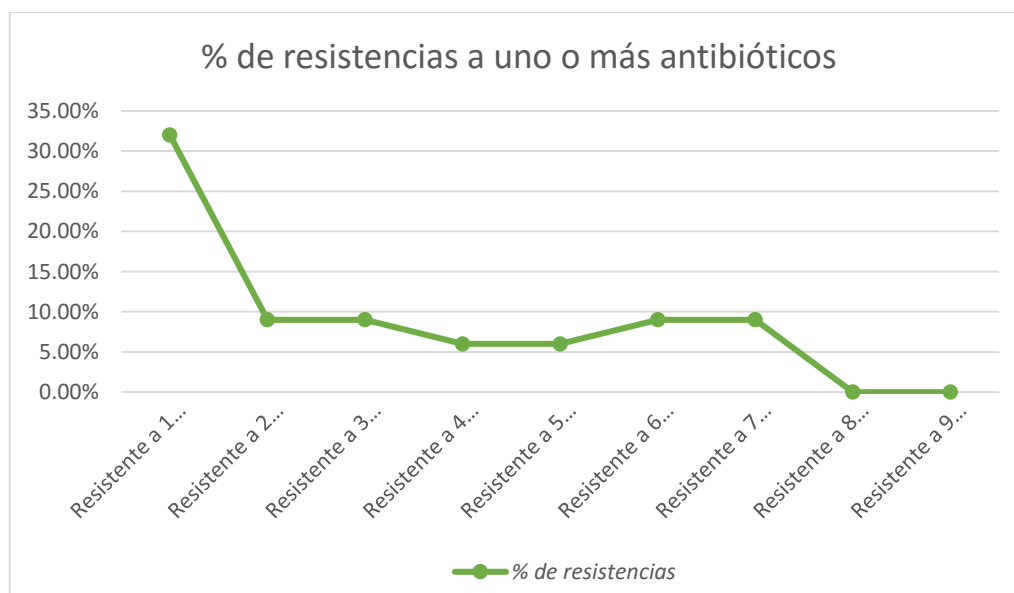


**Gráfico 4.3. Porcentajes de cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos.**

Asimismo, de las 31 cepas de *Escherichia coli* aisladas, se encontró que 26 (83 %) fueron resistentes al menos a uno de los seis antimicrobianos investigados, mientras que no se halló ninguna cepa resistente a todos los discos de antibióticos probados (Tabla 4.2; Gráfico 4.4).

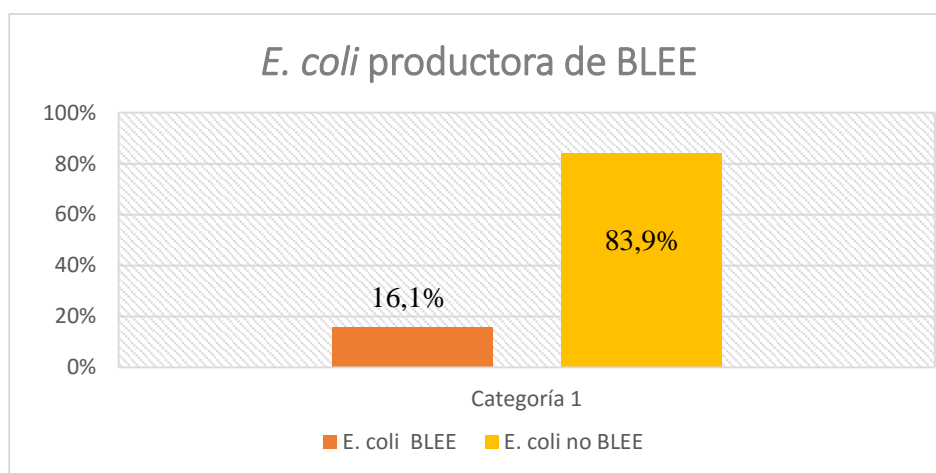
**Tabla 4.2. Porcentaje de resistencias de cepas de *E. coli* a uno o a más de un antibiótico**

	Cepas <i>E. coli</i> (N)	Cepas <i>E. coli</i> (%)
<b>Resistente a 1 antimicrobiano</b>	10/31	32,25
<b>Resistente a 2 antimicrobianos</b>	3/31	9,68
<b>Resistente a 3 antimicrobianos</b>	3/31	9,68
<b>Resistente a 4 antimicrobianos</b>	2/31	6,45
<b>Resistente a 5 antimicrobianos</b>	2/31	6,45
<b>Resistente a 6 antimicrobianos</b>	3/31	9,68
<b>Resistente a 7 antimicrobianos</b>	3/31	9,68
<b>Resistente a 8 antimicrobianos</b>	0/31	0,0
<b>Resistente a 9 antimicrobianos</b>	0/31	0,0



**Gráfico 4.4. Porcentajes de resistencia a antibióticos en aislamientos de *E. coli*.**

Para saber si estas cepas eran productoras de betalactamasas de espectro extendido se realizó primero una prueba de tamizaje y a las cepas que presentaban resistencia a uno de los antimicrobianos se les realizó la prueba de Jarlier o confirmatoria para betalactamasas de espectro extendido; así, el 16.1% (5/31) de las cepas de *E. coli* fueron productoras de BLEE en la prueba de Jarlier (Gráfico 4.5).



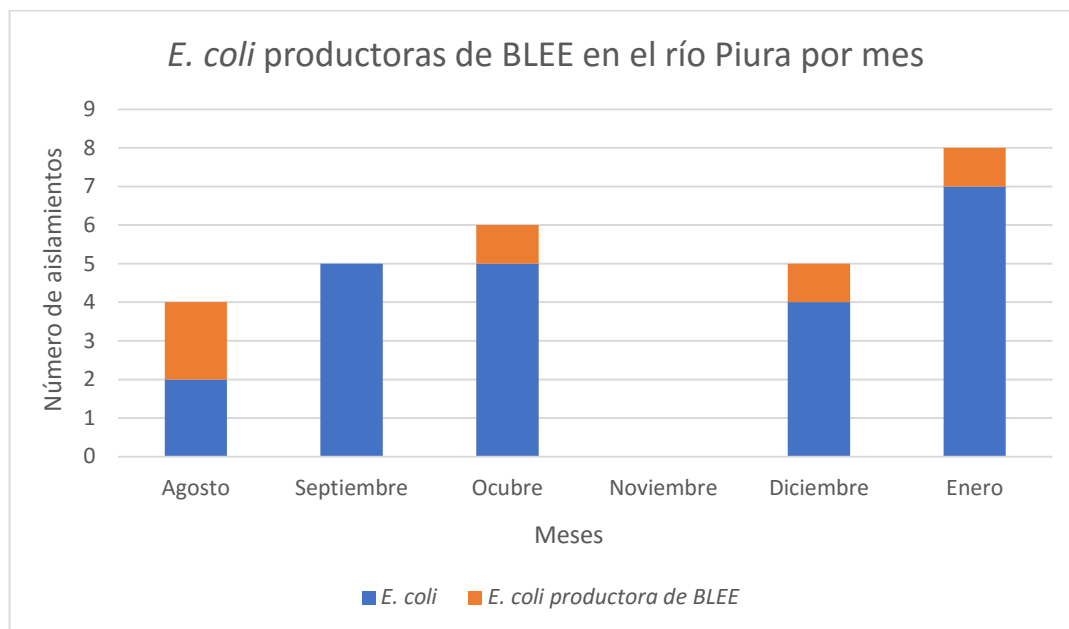
**Gráfico 4.5. Porcentaje de *E. coli* productoras de BLEE y porcentaje de *E. coli* no productora de BLEE.**

Las cinco cepas de *Escherichia coli* productores de BLEE se aislaron del punto de muestreo uno entre los meses de agosto 2018 a enero del 2019.

En el punto de muestreo uno se obtuvieron: cuatro cepas de *E. coli* aisladas en el mes de agosto, de las cuáles, dos fueron productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido; en septiembre se aislaron cinco cepas, de éstas, ninguna fue resistente a  $\beta$ -lactámicos; seis cepas se consiguieron en octubre, sólo una fue productora de BLEE; cinco se adquirieron en diciembre, de ellas, una fue resistente a  $\beta$ -lactámicos y ocho cepas se aislaron en enero, de éstas, sólo una fue productoras de BLEE (Gráfico 4.6).

En el punto de muestreo dos se obtuvieron: dos cepas de *E. coli* se aislaron en agosto y una en enero, ninguna de éstas fue productora de BLEE.

En el punto de muestreo tres no se aislaron cepas de *Escherichia coli*.

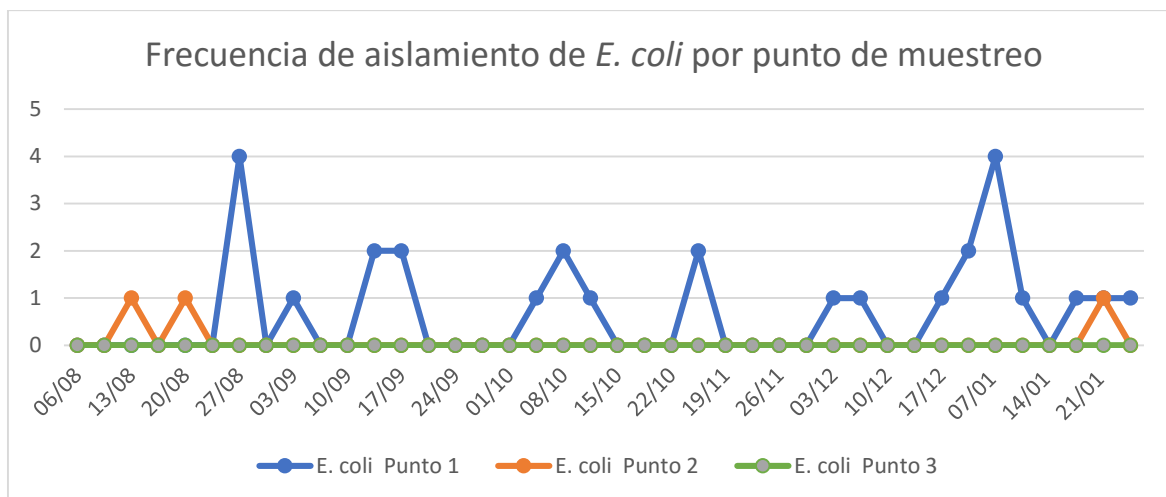


**Gráfico 4.6. *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido aisladas del río Piura en el punto uno entre agosto 2018 y enero 2019.**

Todos los aislamientos fueron correspondientes al punto de muestreo 1. Por otra parte, sólo en los puntos de muestreo 1 y 2 se obtuvieron cepas de *Escherichia coli* (Tabla 4.3).

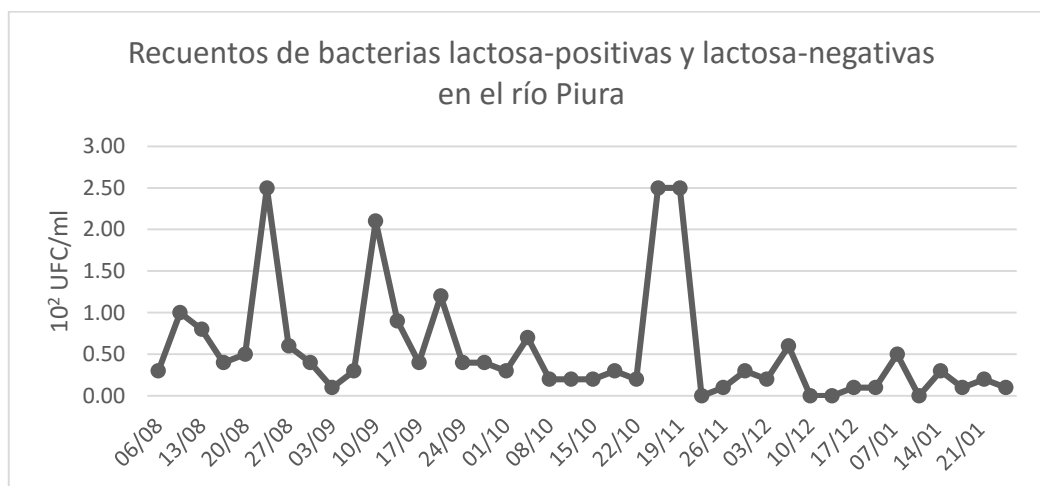
**Tabla 4.3: Aislamientos de cepas de *E. coli* por mes y por puntos de muestreo.**

Mes	Punto 1	Punto 2	Punto 3
Agosto	X	X	
Setiembre	X		
Octubre	X		
Noviembre			
Diciembre	X		
Enero	X		



**Gráfico 4.7. Frecuencia de aislamiento de *E. coli* por punto de muestreo.**

De otro lado, se hizo recuentos de bacterias lactosa-positivas y lactosa-negativas en agar Mc Conkey en muestras de aguas del río Piura, de las zonas de muestreo, durante los meses de agosto 2018 a enero del 2019, obteniéndose promedios máximos en agosto y noviembre (Gráfico 4.8).

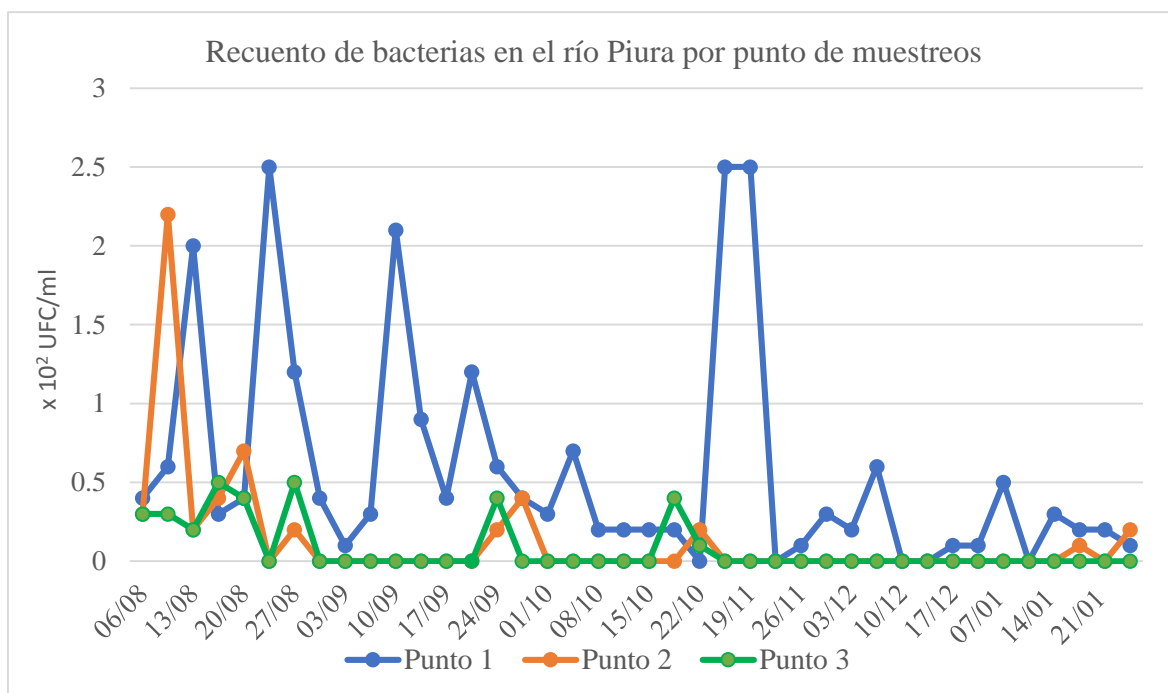


**Gráfico 4.8. Recuentos de bacterias lactosa-positiva y lactosa-negativas en agar Mc Conkey, aisladas de aguas del río Piura en un tramo de la ciudad de Piura, Perú.**

Se hicieron recuentos de bacterias lactosa-positivas y lactosa-negativas en agar Mc Conkey de muestras de agua del río Piura en los puntos de muestreos señalados. En el punto de muestreo uno ubicado aproximadamente frente a la ex Toyota (geoposicionamiento 5°11'35.6"S 80°37'24.6"W), durante los meses de agosto 2018 a enero del 2019, demostró máximos en agosto y noviembre.

En cambio, los recuentos en el punto de muestreo dos ubicado aproximadamente a la altura de Divermotor (geoposicionamiento 5°11'02.0"S 80°37'29.0"W), sólo revelaron un punto máximo durante agosto.

Por lo contrario, los recuentos en agar Mc Conkey en las muestras del punto de muestreo tres ubicado aproximadamente a la altura de la facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad Nacional de Piura (geoposicionamiento 5°10'30.9"S 80°37'18.5"W), mostraron dos puntos máximos durante agosto (Gráfico 4.9).



**Gráfico 4.9. Recuentos de bacterias en agar Mc Conkey, en el río Piura, en un tramo de la ciudad, entre agosto de 2018 y enero de 2019.**

## 4.2. DISCUSIÓN

En el río San Juan, Mendoza, Argentina se aislaron poblaciones de *E. coli* resistente a antibióticos, siendo la resistencia a ampicilina la más significativa (Bianchi, Varela, Flores, & Durando, 2014), mientras que en Valdivia, Chile, en aguas del río Llolel hue se demostró elevados recuentos de bacterias organótrofas mesófilas viables y de coliformes totales, lo que indicaría que se podría deber a la contaminación proveniente del sector agropecuario, descargas constantes de las aguas domiciliarias sin tratamientos, desechos forestales e industriales y líquidos que filtran desde vertederos (Von John, 2006). De otro lado, en Pernambuco, Brasil, se determinó que la mala calidad del agua de regadío de campos de hortalizas trajo como consecuencia la contaminación de estos alimentos con bacterias coliformes, con el consiguiente riesgo para la salud de los consumidores (Souza, de Lima, Queiroz, Luna de Araújo, & Jácome, 2016). Asimismo, los ecosistemas de los ríos de La Habana, Cuba, que están sometidos a un proceso antrópico acelerado y que en sus aguas se vierten residuos de origen doméstico, industrial y agrícola, así como las escorrentías del periodo lluvioso que arrastran las heces de animales que viven en las riveras, resultaron en una situación en la que la calidad de sus aguas se ve afectada de manera negativa, especialmente por la presencia de *E. coli* (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012). Es así que, en las últimas décadas el ascenso de la circulación de cepas de *E. coli* ambientales y sobre todo en el medio acuático, así como el incremento de infecciones intestinales y extraintestinales asociadas a esta bacteria suscita un interés creciente por establecer el riesgo que representa para la salud pública y conocer las características de la resistencia antimicrobiana de aislados ambientales de esta especie (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012), porque la presencia de resistencia bacteriana en una cuenca hidrográfica se debe en gran medida a la actividad humana y al vertimiento de aguas residuales (HaoChang, y otros, 2012). En la presente investigación se aisló 31 cepas de *E. coli*, y la situación del río estudiado presenta similares condiciones lo que supondría el mismo riesgo para la población de Piura. Ya que, la exposición de microorganismos a ambientes contaminados, ha ocasionado la aparición y la selección de bacterias resistentes a diversos antibióticos.

Por otro lado, la resistencia bacteriana a los antibióticos sustenta la existencia ambiental de resistencia a estos antimicrobianos en un sistema acuático de agua dulce, en el cual están presentes bacterias diferentes a las de origen fecal. Esto permite corroborar que la resistencia a estos antimicrobianos en ambientes naturales debe ser considerada en la población bacteriana total (Martínez, y otros, 2010). Por ejemplo, en un canal de aguas grises en la provincia de Buenos Aires, Argentina se encontró *Escherichia coli* resistente a ceftriaxona, ceftazidima y ampicilina (Nuñez, Tornello, Puentes, & Moretton, 2012) y en el río Almendares, Costa Rica, se encontró *E. coli* resistente a ampicilina y sulfametoxazol-trimetoprim, y sensibles a amikacina y gentamicina (Tzoc, Arias, & Valiente, 2004). Así mismo, en México reportaron que cepas de *E. coli* obtenidas de aguas del río Alseseca fueron resistente a cefotaxima y trimetoprim sulfametoxazol (Rivera & Cedillo, 2005). Es decir, en ríos de distintos lugares se ha encontrado *E. coli* resistente a diversos antibióticos, de tal forma que los resultados anteriores son semejantes a los perfiles de resistencia hallados en el presente trabajo.

Del mismo modo, en La Habana (Cuba) se investigó la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas y se obtuvieron mayores porcentajes de resistencia frente a ampicilina, sulfametoxazol – trimetoprim y ciprofloxacina (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012), semejante a lo encontrado en el presente estudio en lo referente a la resistencia a ampicilina y sulfametoprim.

El uso intensivo de antibióticos para fines que no son los clínicos ha contribuido a la aparición de microorganismos resistentes. Además, se utilizan en agricultura y ganadería. El 50% de todos los antibióticos fabricados en el mundo son para uso agrícola y ganadero. También se usan en acuicultura y avicultura. Está comprobado que los antibióticos que se utilizan de forma abusiva, durante períodos de tiempo largos y en dosis altas en la alimentación de animales de crianza, provocan brotes de infecciones transmitidas por los alimentos debido a la selección de patógenos resistentes a los antibióticos (Maguiña-Vargas, Ugarte-Gil, & Montiel, 2006; Cornejo-Juárez, Velásquez-Acosta, Sandoval, Gordillo, & Volkow-Fernández, 2007; Madigan, Martinko, Dunlap, & Clark, 2009; Pacheco, 2012).



En Valencia, España, se aisló *E. coli* de aguas residuales y se demostró que el 75% de los aislados fueron resistentes frente a ampicilina y el 72% al ciprofloxacino (Bertomeu, 2017), tal como en este estudio, que también se observó una mayor resistencia a ampicilina (80,6%) pero no para ciprofloxacino para la cual se obtuvo 8,4 % de resistencia.

En Bogotá, Colombia se analizó aguas residuales hospitalarias y se aisló *E. coli* que presentó resistencia múltiple a diversos antibióticos, siendo sensible a amikacina y a ceftriaxona (Bolaños & More, 2015), al igual que en La Habana, Cuba, donde se determinó que un hospital consumió importantes volúmenes de agua por día, generando otro similar de agua residual con microorganismos patógenos, que se vierten a distintas fuentes de agua, afectando su calidad y poniendo en riesgo la salud (Caridad, 2008), mientras que en aguas residuales de un hospital y de una planta de tratamiento de aguas residuales, en Sao Paulo, Brasil, se encontró *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas, lo que indicaría adaptabilidad de dichos aislamientos a ambientes acuáticos (Picão, y otros, 2013). En Puno, Perú, en una laguna de oxidación se demostró la presencia de *Escherichia coli*, *Enterobacter sp* y *Klebsiella sp*. Que presentaron sensibilidad a los antibióticos ceftriaxona y cefotaxima respectivamente (Coila, 2017). Parece haber una correspondencia entre efluentes hospitalarios y presencia de patógenos resistentes a antimicrobianos, tanto es así que, en Tolima, Colombia, se encontró una relación estadísticamente significativa entre la cobertura de acueducto, alcantarillado, nivel educativo y calidad del agua, que evidenció la presencia de coliformes (Briñez, Guarnizo, & Arias, 2012) y también se demostró que efluentes hospitalarios pueden convertirse en reservorios para la selección de bacterias resistentes (Nuñez & Moretton, 2006). En la presente investigación se observó que en el curso del río Piura funciona un hospital, el cual podría ser la fuente de las bacterias aisladas, tanto las resistentes a los antibióticos como las sensibles.

Por otra parte, la existencia de cepas de *E. coli* con resistencia frente a diferentes antibióticos, se debe también a la presencia de asentamientos poblacionales con poca o ninguna conexión al sistema de alcantarillado que vierten sus desechos directamente a las aguas de este río de forma continua, lo cual, contribuye a que los niveles de este microorganismo se mantengan

(Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012). La presencia de bacterias resistentes a antibióticos en el medio acuático se ha incrementado a raíz del uso intensivo de estos medicamentos. La resistencia a los antibióticos se ha detectado en bacterias presentes en líquidos cloacales urbanos, líquidos residuales hospitalarios, barros cloacales, aguas subterráneas, y en ríos contaminados con descargas cloacales (Nuñez, Tornello, Puentes, & Moretton, 2012). Los datos recopilados en el presente trabajo permiten afirmar que el río Piura presenta la misma situación. En el tramo urbano del río Piura, entre Los Ejidos y el Puente Grau se sabe que existen once emisores que descargan aguas servidas al cauce.

A largo del Río Piura se pudo apreciar fuentes de contaminación como puntos de descarga de desagüe. Por ejemplo, el emisor El Chipe se encuentra ubicado a la altura de la antena de TV de Frecuencia Latina, a 60 m aguas abajo del Puente Cáceres, mientras que el emisor Isaac Rodríguez está ubicado a la altura del cuartel del mismo nombre. Existe dos emisores alrededor del Hospital Regional III Cayetano Heredia; uno, supuestamente clausurado, se encuentra cubierto por una piedra; mientras que el otro se cree que arroja descargas que provienen de la residencia de los médicos y no del Hospital Regional, cuyos desagües van a la red de alcantarillado. Otro emisor está ubicado a altura del ex-colegio Salesiano; éste recibe desagües de la calle Lima y zonas aledañas. El emisor llamado Sánchez Cerro está situado en la margen izquierda del río, a 100 metros aguas arriba del puente del mismo nombre. El emisor Bolognesi se encuentra emplazado a 50 m aguas arriba del puente del mismo nombre, a la altura de la avenida Junín, en el distrito de Castilla, y recibe las aguas de zonas aledañas; en cambio, el emisor Piura está ubicado a la altura de la avenida Circunvalación, aproximadamente a 250 m aguas abajo del Puente Bolognesi. Este emisor vierte aguas negras provenientes del Camal Municipal y zonas aledañas. También existe el emisor CNC, perteneciente a una planta procesadora de papa, que posee permiso para funcionar; así como el emisor Cahuide, situado a la altura de la calle homónima, mientras que el emisor Cortijo está ubicado a la altura del A.H. Independencia (Universidad de Piura, s.f.). Estos emisores arrojan aguas residuales sin tratamiento a la rivera del río Piura, contaminándolo.

También, se han encontrado coliformes fecales y coliformes totales en el agua del río Piura en el tramo urbano, entre el puente Grau y Presa Los Ejidos (Labán, 2006), mientras, que en el presente trabajo el recuento de bacterias en agar Mc Conkey del río Piura fue mayor en el punto uno a la altura del local denominado ex Toyota debido a la presencia de colectores cerca a este punto y, menor en el punto tres a la altura de la Facultad de Ingeniería Industrial de la UNP esto en consecuencia a que antes de este punto no se ubica ningún emisor de efluentes de aguas residuales, industriales y domésticas.

De otro lado, los lodos de las plantas depuradoras de aguas residuales incorporan bacterias a los suelos y esos microorganismos parecen persistir en el suelo durante periodos prolongados de tiempo. Así, el periodo de permanencia de los coliformes fecales en un suelo agrícola puede ser superior a un año desde la adición de los lodos, dependiendo de la cantidad utilizada llegando a extender su presencia hasta 2 años después de la adición de lodos de depuradora en las parcelas (Nadal, Gondim, Platero, & Navarro-García, 2015). Las escorrentías que se producen durante el período lluvioso arrastran las heces de animales que viven en las riveras de estos ríos. El conjunto de estos eventos explica la presencia de la especie *E. coli* (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012; Bertomeu, 2017). Algunos tipos de fertilizantes utilizados en los campos de cultivos en la ribera del río Piura provienen de sustancias residuales o, inclusive, se riegan los cultivos con aguas residuales, lo que podría explicar la presencia de bacterias en aguas del río.

De otro lado, las betalactamasas de espectro extendido (BLEE) constituyen uno de los principales mecanismos de resistencia con los que cuentan los microorganismos (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas, & Eslava, 2012). Las BLEE parecen ser exitosas en parte por la propagación de clones bacterianos que las producen, a la transferencia de plásmidos portadores de los genes correspondientes o al intercambio de genes que codifican la BLEE en elementos móviles. Esto dificulta la identificación de rutas de transmisión y fuentes de bacterias productoras

de BLEE (Valentin, y otros, 2014). Esto significaría que en el ecosistema del río Piura existirían distintas cepas de *E. coli* resistentes a antibióticos.

Asimismo, se determinó que la mayoría de los genes de BLEE se encontraron en poblaciones humanas y no humanas, aunque se detectaron diferencias cuantitativas para distintos tipos de BLEE (Valentin, y otros, 2014). Se ha planteado que bacterias filogenéticamente diversas, ampliamente distribuidas en el ambiente, muestran capacidades de subsistir frente a antibióticos naturales y sintéticos. De esta manera, constituyen reservorios naturales de genes codificadores de resistencia, que pueden ser transferidos horizontalmente a microorganismos patógenos, que comparten el mismo hábitat. Se ha sugerido que existe intercambio genético entre bacterias entéricas y la comunidad bacteriana autóctona, confiriéndole resistencia a antibióticos (Martínez, y otros, 2010). Se ha establecido que la multirresistencia a antibióticos provee a las cepas ventajas selectivas y la evidencia de laboratorio demuestra que bacterias con resistencia a múltiples antibióticos pueden mantener este fenotipo por muchos años en medios de mantenimiento y sin la incorporación de antibióticos. La selección y diseminación en la naturaleza de cepas resistentes a los antibióticos es una práctica que se debe evadir, con el fin de mantener un balance ecológico que favorezca el predominio de bacterias susceptibles y asegurar el tratamiento efectivo de las enfermedades infecciosas humanas (Tzoc, Arias, & Valiente, 2004). Es decir, en un medio donde existe presión hacia la transferencia de genes de resistencia, como es el efluente hospitalario, existe una gran probabilidad de que la eventual reutilización de agua en actividades tan diversas como agricultura, recreación, pesca, etc., permita la llegada de cepas multirresistentes al ser humano.

Por otra parte, se aisló *Enterobacteriaceae* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas partir de muestras de leche de tanque de hatos lecheros localizados en Entreríos, Antioquia (Colombia). Todos los aislamientos fueron resistentes a varios antibióticos y albergaban enzimas blaCTX-M-96, que puede constituir un riesgo para la salud pública. Es importante evaluar si los alimentos de origen animal constituyen un reservorio de genes de resistencia (Vásquez-Jaramillo, Ramírez, Akineden, & Fernández-Silva, 2017).

Asimismo, en Bogotá, Colombia se determinó que las muestras de leche cruda evidenciaron la presencia de antibióticos, especialmente de penicilina (Máttar, Calderón, Sotelo, Sierra, & Tordecilla, 2009). Es decir, fuentes adicionales de bacterias productoras de BLEE lo constituyen no sólo los residuos y efluentes hospitalarios, sino también elementos tales como los productos de la agricultura, la ganadería y la avicultura.

De otro lado, se determinó que el genoma de una variante de la cepa K12 de *E. coli* contiene 4 639 221 pares de bases de DNA circular de doble cadena (4,6 Mb). Se calcula que el genoma contiene 4 288 ORFs (marcos de lectura abierta), de los cuales un 28% no tienen función conocida. Esto permite estimar en alrededor de tres mil los genes del genoma de *E. coli*. Es posible que otras cepas tengan diferencias en su estructura genómica y en el tamaño, con una variación de 4,4 a 5,5 Mb. Asimismo, existe información genética adicional en forma de elementos extracromosomales o plásmidos, de alrededor de 25 kb, que son fácilmente movilizables entre cepas. Se han descrito cerca de 300 tipos de plásmidos en la especie con información para la producción de enzimas, colicinas, para la resistencia a antibióticos y a metales pesados, inmunidad contra fagos, para el intercambio genético y fimbrias relacionadas con la patogénesis y toxinas (Souza, y otros, 2001). Los microorganismos portadores de este tipo de mutaciones tienen más probabilidades de aparecer en ambientes hospitalarios, que constituyen la principal fuente de contaminación hacia el ambiente.

Los genes de resistencia a los diferentes antimicrobianos se relacionan con elementos genéticos móviles tales como plásmidos, transposones e integrones. El integrón actúa como un casete de expresión para los genes que se inserten y por lo general más de un gen se integra con frecuencia, lo que genera numerosas reconfiguraciones y combinaciones de casetes y que seleccionan la resistencia a diferentes antibióticos, de tal manera que es posible una multirresistencia que se disemina mediante transposones o plásmidos (Garza-Ramos, Silva-Sánchez, & Martínez-Romero, 2009). La gran flexibilidad genómica de *E. coli* le confiere una plasticidad ecológica extraordinaria; puede adaptarse rápidamente a diferentes ambientes y es capaz de vivir como un organismo de vida libre o como comensal mutualista del colon en

mamíferos y aves. (Souza, y otros, 2001). Además, el estudio de los genomas bacterianos indica que un gran número de genes se ha adquirido por transferencia horizontal (Garza-Ramos, Silva-Sánchez, & Martínez-Romero, 2009), fenómeno que seguramente también ocurre en *E. coli*.

En tanto, se estima que en *E. coli* la mutación espontánea ocurre a una velocidad de  $5 \times 10^{-10}$  por genoma por generación, y que, en un día, en cada persona viva, se producen unas dos mil bacterias mutantes. Es decir, la cantidad de bacterias que han mutado por lo menos una vez en un día en el mundo alcanza números inimaginables. En general las mutaciones ocurren en lugares al azar y, por lo tanto, afectan a diversos genes, en ocasiones a aquéllos que se relacionan con la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Mendoza, 2011). También, las mutaciones puntuales en muchos sitios del gen pueden conferir resistencia, por ejemplo, a las betalactamasas, la propiedad de inactivar las cefalosporinas de última generación (Abreu, y otros, 2013; Allen, 2014). Es decir, además de la presión de selección por el abuso en el empleo de antibióticos el riesgo de aparición de resistentes se incrementa por la existencia del fenómeno de mutación espontánea.

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema grave de salud pública causante de índices elevados de morbilidad hospitalaria. En la medida en que se usan los diferentes antibióticos se seleccionan bacterias resistentes a múltiples fármacos. En microbiología se han desarrollado diferentes pruebas de laboratorio, como las tiras E-test, discos impregnados con antibiótico y medios cromogénicos, entre otros, para identificar de manera convencional el patrón de resistencia a los antibióticos y los posibles mecanismos de resistencia. El desarrollo de nuevas herramientas moleculares de la genómica y proteómica, y la bioinformática, permite conocer mejor la fisiología y estructura de las bacterias y los mecanismos de resistencia a los antibióticos (Garza-Ramos, Silva-Sánchez, & Martínez-Romero, 2009). Es decir, en general, existen métodos fenotípicos y genotípicos para determinar la existencia de cepas productoras de betalactamasas, cada una de ellas con sus ventajas y desventajas.

## CONCLUSIONES

- Se aisló *Escherichia coli* de aguas en un tramo del río Piura de la ciudad de Piura, Perú entre los meses de agosto del 2018 y enero del 2019.
- Se obtuvieron cepas de *E. coli* resistente a antibióticos, las cuáles, el 80,6% fueron resistentes a ampicilina; 41,9%, a sulfametoprim; 35,5% a cefotaxima y 35,5% a ceftriaxona.
- El 16,1% de las cepas de *E. coli* fueron productoras de betalactamasas de espectro extendido.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda:

A las autoridades competentes, implementar medidas de control en el uso de antibióticos, para prevenir que cepas bacterianas sensibles se vuelvan resistentes por la presión selectiva a partir del contacto con aquéllos.

A los organismos pertinentes, se realicen monitoreos continuos a las aguas del río Piura, ya que estas aguas son utilizadas por los pobladores que vive en sus cercanías, para la agricultura, ganadería y pesca artesanal.

Al público en general, no utilizar el río Piura para actividades de recreación que incluyan contacto directo con las aguas, como por ejemplo bañarse, debido a que se encuentra contaminado con bacterias resistentes a los antibióticos.

Al público en general, no beber agua del río Piura, no consumir los vegetales de tallo corto que hayan sido cosechados de sembríos a la ribera del río sin previo tratamiento de desinfección y tampoco peces en estado crudo procedentes de este río, por el riesgo de contener microorganismos patógenos resistentes a antimicrobianos.

A investigadores científicos, tesisistas y alumnos, continuar con la investigación genotípica de las cepas de *E. coli* obtenidas para determinar a cuál de los seis tipos patógenos pertenecen; además, iniciar la investigación sobre otros géneros bacterianos aislados de aguas del río Piura, que también podrían ser resistentes a antibióticos.

Al público en general, trabajar para descontaminar el río Piura, única fuente de agua de esta ciudad.



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, R., Castro-Hernández, B., Madueño, A., Espigares-Rodríguez, E., Moreno-Roldán, E., Moreno, P., . . . Arias, A. (2013). Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aisladas en pollos de granjas avícolas de la isla de Tenerife. *Higiene y Sanidad Ambiental*, 13(4), 1091-1096.
- Acevedo, R., Severiche, C., & Jaimes, J. (2015). Bacterias resistentes a antibióticos en ecosistemas acuáticos. *Producción + Limpia*, 10(2), 160-172.
- Alejos, I. (2017). *Caracterización de la susceptibilidad a antibióticos betalactámicos de espectro extendido, ciprofloxacina y cotrimoxazol de cepas de E. coli aisladas de zonas de amortiguamiento cercanas a crianza de Argopecten purpuratus en la bahía de Sechura, Piura*. Tesis de pre-grado, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima.
- Allen, H. (2014). Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animales. *Current Opinion in Microbiology*, 19, 25-9. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.001>
- Autoridad Nacional del Agua. (2015). *Evaluación de recursos hídricos superficiales en la cuenca del río Piura*. Piura: Ministerio de Agricultura y Riego.
- Bécares, E., Martín, J., Hijosa, M., & Sidrach-Cardona, R. (2011). Bacterias resistentes a antibióticos en medios acuáticos. *Seguridad y Medio Ambiente*, 31(124).
- Benvenuto, V. (2017). *Determinación de Escherichia coli enteropatógena (ECEP) en agua de mar del Circuito de Playas de la Costa Verde*. Tesis de pre-grado, UNIVERSIDAD RICARDO PALMA, Lima.
- Bertomeu, A. (2017). *Detección de resistencias a antibióticos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales de la provincias de Valencia*. Tesis pre-grado, Valencia.

- Bianchi, V., Varela, P., Flores, D., & Durando, P. (2014). Evaluación de *Escherichia coli* resistente a antibióticos como especie bioindicadora de contaminación fecal en agua y peces en la cuenca inferior del río San Juan. *Natura Neotropicalis*, 45(1), 45-69.
- Bolaños, D., & More, L. (2015). *Evaluación de la resistencia a Ceftriaxona, Amikacina y Oxacilina en Escherichia coli presente en vertimientos de agua residual del Hospital de Suba II Nivel E.S.E en Bogotá*. Tesis de pre-grado, Universidad Santos Tomás, Bogotá.
- Briñez, K., Guarnizo, J., & Arias, S. (2012). Calidad del agua para consumo humano en el departamento del Tolima. *Rev. Fac. Nac. Salud Pública*, 30(2), 174-182.
- Cabrera, C., Gómez, R., & Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med*, 38(2), 149-158.
- Canet, J. (19 de Enero de 2016). *Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención*. Recuperado el 11 de Abril de 2019, de Betelgeux: <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Caridad, A. (2008). Aguas residuales generadas en hospitales. *INGENIERÍA HIDRÁULICA Y AMBIENTAL*, 29(2), 56-60.
- Carillo, E., & Lozano, A. (2008). *Validación del método de detección de coliformes totales y fecales en agua potable utilizando agar chromocult*. Trabajo de grado, Pontificia Universidad Javeriana.
- Castañeda, Y., López, P., Figueroa, Y., & Fuentes, J. (2009). Susceptibilidad a antibióticos de bacterias indicadoras de Contaminación fecal aisladas de aguas y sedimentos marinos de playas de la isla de Margarita, Venezuela. *SABER*, 21(1), 12-19.
- Castillo, L., Martínez, R., López, L., Ticante, J., & Muñoz, A. (2007). *Aislamientos y selección de coliformes fecales resistentes a antibióticos provenientes de dos plantas de tratamiento de*

- aguas residuales de la ciudad de Puebla*. Posgrado en ciencias ambientales, Universidad Autónoma de Puebla, México.
- Chávez-Castillo, A., Arreguín-Espinosa, R., Cifuentes-Blanco, J., & Rodríguez-Bustamante, E. (2017). ¿Cómo funcionan los microbios? *Ciencia*, 68(2).
- CLSI. (2018). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Coila, G. (2017). *Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias coliformes aisladas de la laguna de oxidación Espinar de la ciudad de Puno*. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología, Puno.
- Colquechagua, F., Sevilla, C., & Gonzales, E. (2015). Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en muestras fecales en el Instituto Nacional de Salud del Niño, Perú. *Rev. perú. med. exp. salud publica*, 32(1), 26-32.
- Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (Mayo de 2015). *Pediamécum*. Recuperado el 17 de mayo de 2019, de <http://www.pediamecum.es>
- Cooke, M. (1976). Antibiotic resistance among coliform and fecal coliform bacteria isolated from sewage, seawater, and marine shellfish. *Antimicrob. Agents Chemother*, 9(6), 879-884.
- Cornejo-Juárez, P., Velásquez-Acosta, C., Sandoval, S., Gordillo, P., & Volkow-Fernández, P. (2007). Patrones de resistencia bacteriana en urocultivos en un hospital oncológico. *Salud pública Méx*, 49(5).
- Echevarría, J., & Iglesias, D. (2003). Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los gram positivos. *Rev Med Hered*, 14(4).
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., & Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Rev Cubana Med Milit*, 32(1), 44-48.

- Fernández, L. (2017). *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), un problema creciente en nuestros pacientes. *Rev Med Hered*, 28(3).
- Flores, C., & Ramírez, B. (13 de mayo de 2010). *Medio Agar Hierro Lisina*. Obtenido de Bacteriología: <http://fgyrbmesa3.blogspot.pe/2010/05/medio-agar-hierro-lisina.html>.
- Forbes, B., Sahm, D., & Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Buenos Aire, Argentina: Médica Panamericana.
- Galán, J., Moreno, A., & Baquero, F. (2014). Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Rev Esp Salud Pública*, 88, 829-837.
- García, A., García, E., Hernández, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J., & Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Rev Esp Quimioter*, 24(2), 57-66.
- Garza-Ramos, U., Silva-Sánchez, J., & Martínez-Romero, E. (2009). Genética y genómica enfocadas en el estudio de la resistencia bacteriana. *Salud Pública de México*, 51(3), 439-446.
- Gómez, C., Plata, M., Sejnau, J., Rico, C., & Vanegas, S. (2009). Resistencia de la *E. coli* en urocultivos de pacientes con sospecha de infección urinaria intra y extra – hospitalaria en la Fundación Santa Fe de Bogotá. *Rev Urología Colombia*, 18(1), 53-58.
- Gonzales, S. (2016). *Frecuencia de Escherichia coli productoras de betalactamasas aislados de urocultivos de pacientes del Hospital Victor Lazarte Echegaray, Trujillo, 2015*. Tesis de pre-grado, Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
- HaoChang, S., GuangGuo, Y., Ran, T., RuiQuan, Z., JianLiang, Z., & YouSheng, L. (2012). Class 1 and 2 integrons, sul resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environmental Pollution*, 169, 42-49. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.05.007>

- Hernández-Acosta, E., Quiñones-Aguilar, E., Cristobal-Acevedo, D., & Rubiños-Panta, J. (2014). Calidad biológica de aguas residuales utilizadas para riego de cultivos forrajeros en Tulancingo, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 89-100. doi:10.5154/r.rchscfa.2012.03.024
- Instituto Regional de apoyo a la gestión de los recursos hídricos. (s/a). *Sistema de gestión de la cuenca del río Piura*. Piura: Autoridad autónoma de cuenca hidrográfica Chira-Piura.
- Labán, G. (2006). *Estado actual de la contaminación del río Piura en el tramo urbano, diciembre 2005 - abril 2006* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Piura, Piura, Perú.
- Lezameta, L., Gonzáles-Escalante, E., & Tamariz, J. (2010). Comparación de cuatro métodos fenotípicos para la detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Perú Med Exp Salud Publica*, 27(3), 345–351.
- Lizarbe, A. (2009). BACTERIAS Y VIRUS ¿CÓMO NOS DEFENDEMOS? *Rev.R.Acad.Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, 103(1), 115-172.
- Llenque-Díaz, L., & Acevedo-Hurtado, Y. (2012). Betalactamasas en cultivos de *Escherichia coli* aislados de urocultivos, coprocultivos y de alimentos de la ciudad de Trujillo 2011. *SCIÉND*, 15(2), 1-12.
- MacFaddin. (2000). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (3era ed.). Buenos Aires, Argentina: Médica panamericana.
- Madigan, M., Martinko, J., Dunlap, P., & Clark, D. (2009). *Brobeck. Biología de los microorganismos*. Madrid: Pearson educación, S.A.
- Maguiña-Vargas, C., Ugarte-Gil, C., & Montiel, M. (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Med Per*, 23(1), 15-20.

- Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M., Salgado, I., Olivares, S., . . . Rodríguez, D. (2010). Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aislados del río Almendares. *CENIC*, 41(4).
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de Antibióticos en Leches: Un Problema de Salud Pública. *Rev. salud pública*, 11(4), 579-590.
- Mendoza, A. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Rev. Fac. Med.*, 54(1).
- Morón, F., & Levy, M. (2002). *Farmacología general*. La Habana: Ciencias médicas.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., & Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*, 28(4), 648-56.
- Nadal, I., Gondim, C., Platero, L., & Navarro-García, F. (2015). Uso de lodos de depuradora en agricultura: patógenos y resistencias a antibióticos. *Rev. salud ambient*, 15(2), 113-120.
- Niemi, M., Sibakov, M., & Niemela, S. (1983). Antibiotic resistance among different species of fecal coliform isolated from water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(1), 79-83.
- Núñez, L., & Moretton, J. (2006). Perfil microbiológico y resistencia bacteriana a desinfectantes en aguas residuales de hospital. *Higiene y Sanidad Ambiental*. 6, 197-201.
- Núñez, L., Tornello, C., Puentes, N., & Moretton, J. (2012). Bacterias resistentes a antibióticos en aguas grises como agentes de riesgo sanitario. *Ambi-Agua*, 7(1), 235-243.
- Pacheco, L. (2012). La resistencia a antibióticos: El efecto colateral. *Horizonte Sanitario*, 11(1), 23-31.
- Picão, R., Cardoso, J., Campana, E., Nicoletti, A., Petrolini, F., Assis, D., . . . Gales, A. (2013). The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the

- occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 76, 80–85.
- Pintado, C. (2015). *Resistencia antibiótica en coliformes termotolerantes aislados de medios acuáticos de Piura y Sechura*. Tesis de pre-grado, Universidad Nacional de Piura, Piura.
- Progobernabilidad. (s/a). *Plan de desarrollo regional concertado Piura 2016 - 2021*. Piura: Gobierno regional de Piura.
- Quizhpe, A., Encalada, L., o Sacoto, A., Andrade, D., Muñoz, G., Calvo, D., & Lara, M. (2014). *Uso apropiado de antibióticos y resistencia bacteriana*. Cuenca, Ecuador: Gráficas del Austro.
- Ramos-Ortega, L., Vidal, L., Vilarly, S., & Saavedra-Díaz, L. (2008). Análisis de la contaminación microbiológica (coliformes totales y fecales) en la bahía de Santa Marta, Caribe Colombiano. *Acta biol. Colomb*, 13(3), 87-98.
- Rivera, J., & Cedillo, L. (2005). Evaluación de la resistencia a antibióticos en enterobacterias aisladas de aguas contaminadas. *Rev Biomed*, 16, 151-152.
- Romeu, B., Salazar, P., Lugo, D., Rojas, N., & Eslava, C. (2012). Susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuícolas. *Rev Cubana Med Trop*, 64(2).
- Sacsaquispe, R., & Velásquez, J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Lima: Ministerio de Salud.
- Sanders, C., & Sanders, W. (1992). Beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis*, 15(5), 824-39.
- Scheutz, F., & Strockbine, N. (2005). Genus I. *Escherichia*. En D. Brenner, *The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria* (págs. 607-623). Springer.
- Silva, J. (2006). Resistencia a antibióticos. *Rev Latinoam Microbiol*, 48(2), 105-112.

- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. *Salud Uninorte*, 32(1), 105-122.
- Souza, A., de Lima, C., Queiroz, J., Luna de Araújo, P., & Jácome, A. (2016). Análise bacteriológica das águas de irrigação de horticulturas. *Rev. Ambient. Água*, 11(2), 428-438. doi:10.4136/ambi-agua.1798
- Souza, V., Castillo, A., Rocha, M., Sandner, L., Silva, C., & Eguiarte, L. (2001). Ecología evolutiva de *Escherichia coli*. *Interciencia*, 26(10), 513-517.
- Sulca, M., & Alvarado, D. (2018). Asociación de la resistencia al mercurio con la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados del litoral de Lima, Perú. *Rev. peru biol.*, 25(4).
- Tucto-Succhil, S., Mercado-Martínez, P., & Hurtado-Escamilo, T. (2014). Resistencia bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el laboratorio de microbiología del Hospital II Chocope-EsSalud (Perú). *REBIOLEST*, 2(1).
- Tzoc, E., Arias, M., & Valiente, C. (2004). Efecto de las aguas residuales hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. *Rev Biomed*, 15, 165-172.
- Universidad de Piura.(s/a). *El río Piura: descripción técnico ambiental, descripción del área de influencia del tramo urbano del río Piura*. Recuperado de: [http://www.biblioteca.udep.edu.pe/bibvirudep/tesis/pdf/1\\_76\\_183\\_41\\_718.pdf](http://www.biblioteca.udep.edu.pe/bibvirudep/tesis/pdf/1_76_183_41_718.pdf) [accesado el 23 de mayo del 2019].
- Valentin, L., Sharp, H., Hille, K., Seibt, U., Fischer, J., Pfeifer, Y., . . . Kreienbrock, L. (2014). Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: An approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *International Journal of Medical Microbiology*, 304, 805–816.



- Vásquez-Jaramillo, L., Ramírez, N., Akineden, O., & Fernández-Silva, J. (2017). Presencia de Enterobacteriaceae productoras de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en tanques de leche de fincas lecheras de Antioquia, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 30, 85-100.
- Vidal, J. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente. *Salud en Tabasco*, 9(1), 188-193.
- Von John, S. (2006). *Calidad bacteriana del agua del río LLollehuel de la X región de Chile*. Tesis de pre-grado, Universidad Austral de Chile, Valdivia.

## ANEXOS

### Anexo 1: Fotografías.



**Figura 1.** Localización de los tres puntos de muestreo a lo largo del río. Fuente Google My Maps.



**Figura 2.** Materiales para la toma de muestra; caja térmica, guantes, termómetro digital, tiras para pH y alcohol de 96°.



**Figuras 3, 4 y 5.** Apunte de datos del día, hora, pH, temperatura del agua y temperatura del aire de cada uno de los tres puntos de muestreo en el río Piura.



**Figuras 6, 7 y 8.** Apunte de datos de pH, temperatura del agua y temperatura del aire de cada uno de los tres puntos de muestreo en el río Piura.



**Figura 9.** Medición de temperatura del agua con termómetro digital.





**Figura 10.** Tira de indicador de pH.



**Figura 11 y 12.** Foto izquierda tira indicador de pH 8 para el punto uno y foto izquierda tira de indicador de pH 7 para el punto dos.



**Figura 13.** Material para la dilución de las muestras de agua.



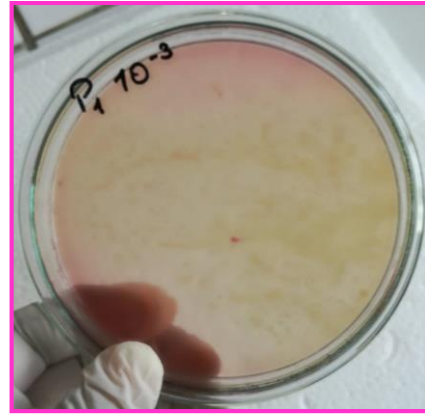
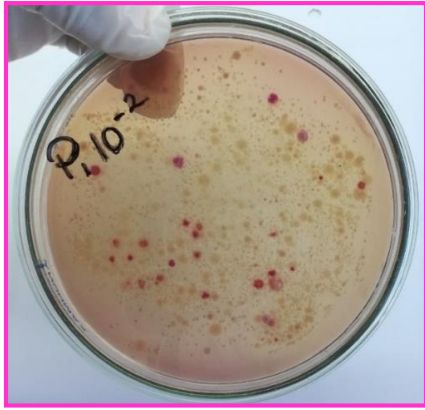
**Figura 14.** Procedimiento de la dilución de las muestras de agua.



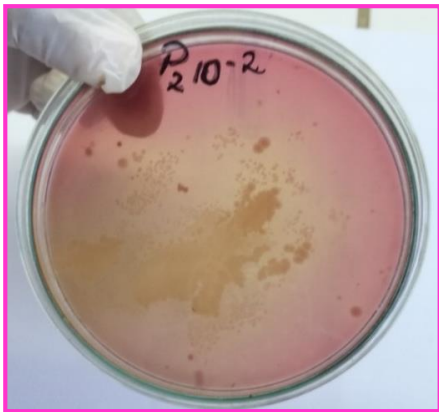
**Figura 15.** Procedimiento de la dilución de las muestras de agua.



**Figura 16.** Siembra por profundidad de las muestras de agua en agar Mc Conkey.



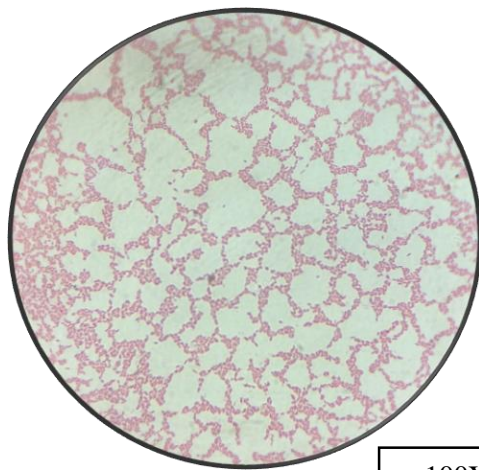
**Figuras 17 y 18.** Crecimiento de colonias en agar Mc Conkey de la muestra de agua del punto uno  
luego de 24 h de incubación.



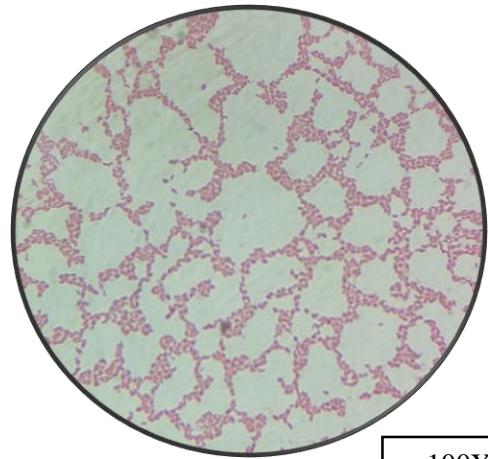
**Figuras 19 y 20.** Crecimiento de colonias en agar Mc Conkey de la muestra de agua del punto dos  
luego de 24 h de incubación.



**Figuras 21 y 22.** Crecimiento de colonias en agar Mc Conkey de la muestra de agua del punto tres  
luego de 24 h de incubación.

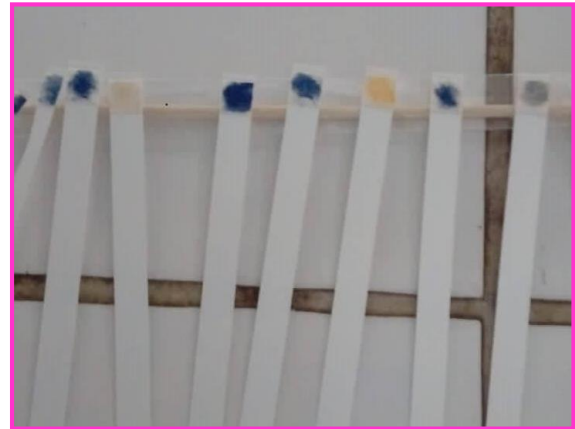
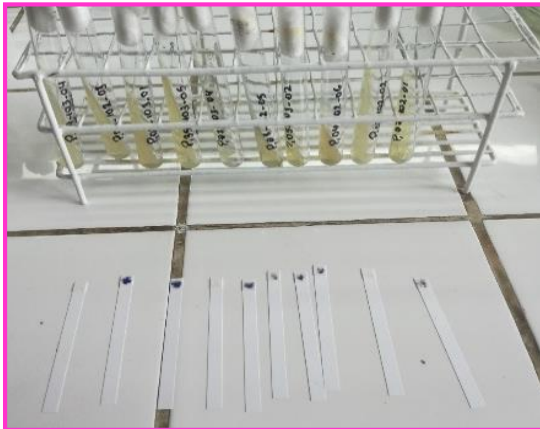


x 100X



x 100X

**Figuras 23 y 24.** Fotos en el microscopio de bacilos gram negativos (*Escherichia coli*).

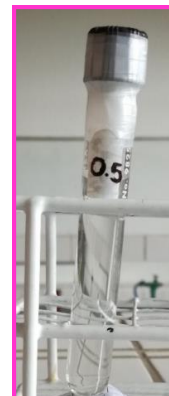


**Figuras 25 y 26.** Prueba de oxidasa; tiras impregnadas con el reactivo de oxidasa. Oxidasa positiva, color azul violeta; oxidasa negativa, color amarillento.





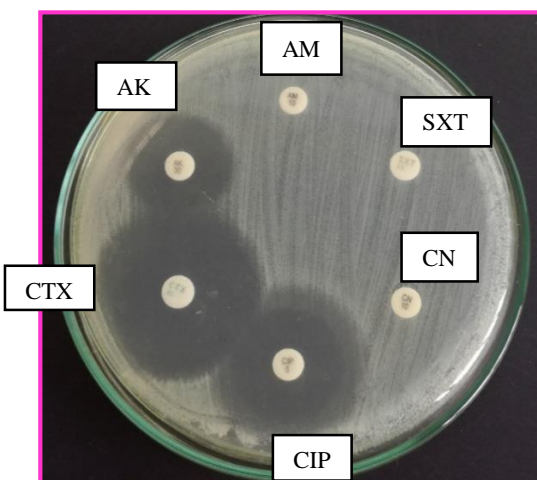
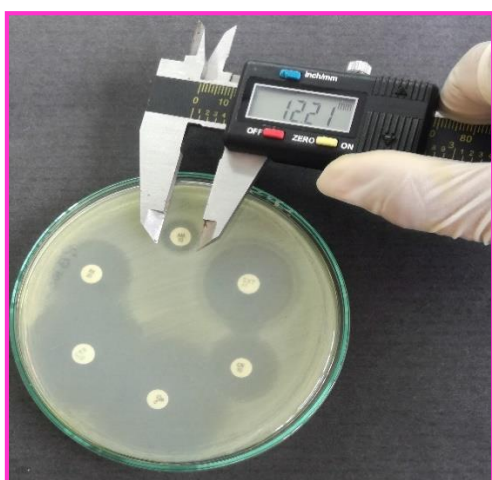
**Figuras 27.** Identificación de *Escherichia coli* a través de pruebas bioquímicas. 1)TSI, agar inclinado ácido / fondo ácido; 2)LIA: resultado positivo, agar inclinado alcalino / fondo alcalino; 3)Citrato de Simmons: resultado negativo, agar inclinado alcalino; 4) SIM: movilidad positiva, indol positivo coloración roja en la superficie del medio, SH<sub>2</sub> negativo; 5)Arabinosa: ácido, resultado positivo; 6)Lactosa: ácido, resultado positivo; 7)Maltosa: ácido, resultado positivo; 8)Manitol: ácido, resultado positivo; 9)Sacarosa: variable (puede ser alcalino o ácido); 10)RM: resultado positivo coloración roja; 11)VP: resultado negativo.



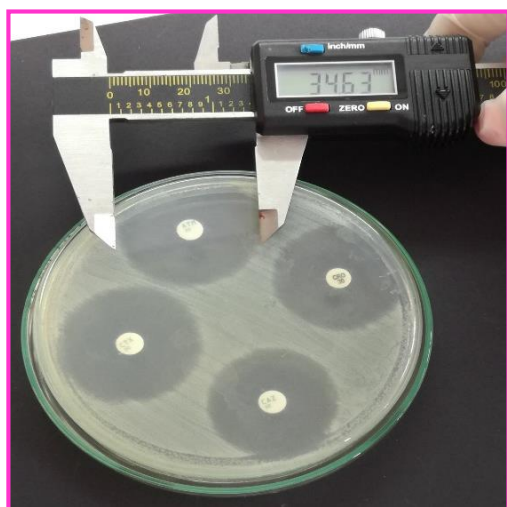
**Figuras 28, 29 y 30.** Preparación del patrón de turbidez de 0,5 McFarland.



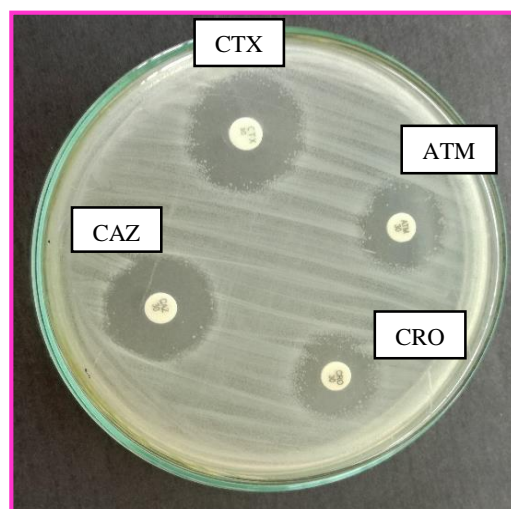
**Figuras 31.** Vernier electrónico digital para medición de halos de inhibición.



**Figuras 32 y 33.** Antibiograma general por el método de Kirby-Bauer.

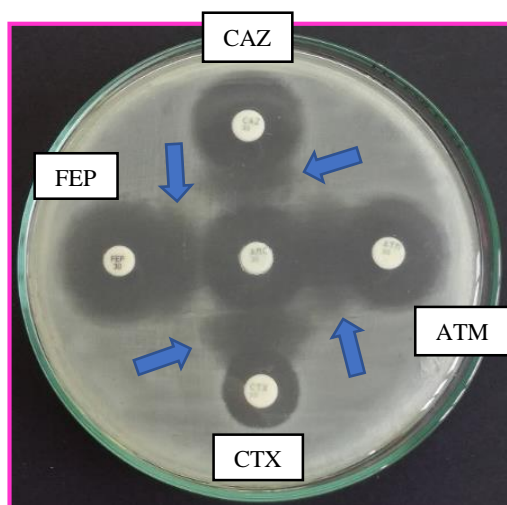


**Figuras 34.** Prueba de tamizaje NEGATIVO para detección de *E. coli* productoras de BLEE.

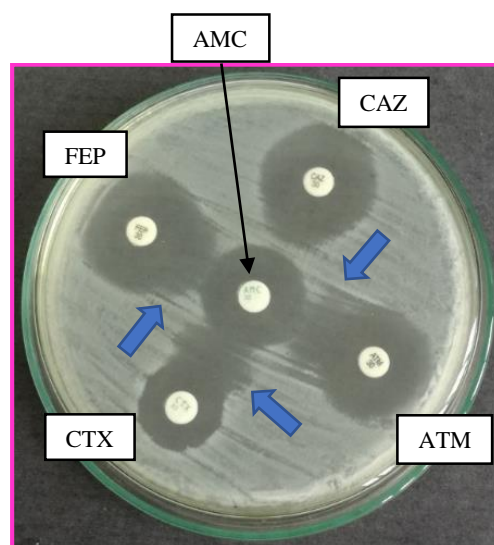


**Figura 35.** Prueba de tamizaje POSITIVO para detección de *E. coli* productoras de BLEE.

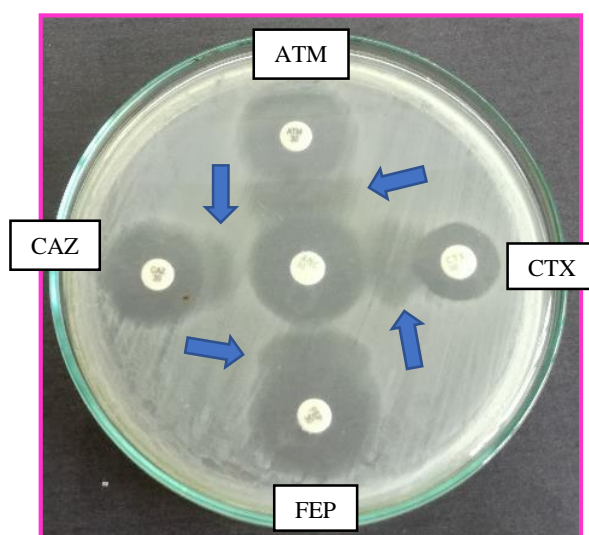




**Figura 36.** Cultivo POSITIVO para test de confirmación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Se observa la sinergia positiva ATM, aztreonam; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidima; disco central AMC, amoxicilina/ácido clavulánico.

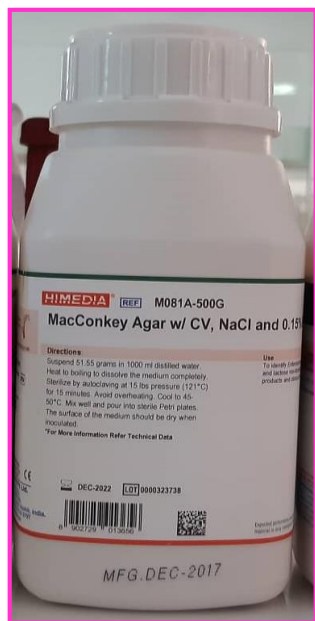


**Figura 37.** Cultivo POSITIVO para test de confirmación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Se observa la sinergia positiva ATM, aztreonam; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; disco central AMC, amoxicilina/ácido clavulánico.



**Figuras 38.** Cultivo POSITIVO para test de confirmación de betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Se observa la sinergia positiva ATM, aztreonam; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; CAZ, ceftazidima; disco central AMC, amoxicilina/ácido clavulánico.

## Anexo 2: Fórmula y preparación de los medios de cultivo utilizados.



### Contenido:

Digerido pancreático de gelatina	17,0 g
Digerido pancreático de caseína	1,5
Digerido péptico de tejido animal	1,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	1,5
Cloruro sódico	5,0
Rojo neutro	0,03
Cristal violeta	0,001
Agar	13,5

**Preparación:** Suspender 50,0 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Servir en placas Petri estériles. Dejar solidificar y refrigerar en nevera a 2-8°C hasta su uso.

**Figura 39.** Envase con agar MacConkey; contenido y preparación.

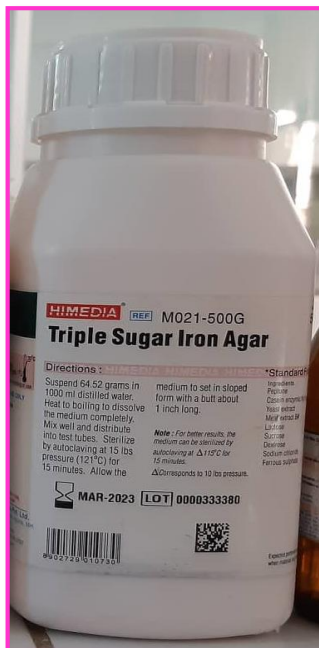


### Contenido:

Extracto de carne bovina	2,0 g
Hidrolizado ácido de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar	17,0

**Preparación:** Suspender 37 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Servir en placas Petri estériles. Dejar solidificar y refrigerar en nevera a 2-8°C hasta su uso.

**Figura 40.** Envase con agar Mueller-Hinton; contenido y preparación.

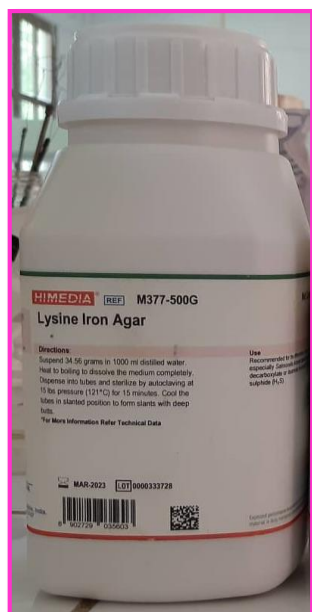


#### Contenido:

Digerido pancreático de caseína	10,0 g
Digerido péptico de tejido animal	10,0
Cloruro sódico	5,0
Lactosa	10,0
Sacarosa	10,0
Glucosa	1,0
Sulfato ferroso de amonio	0,2
Tiosulfato sódico	0,2
Rojo fenol	0,025
Agar	13,0

**Preparación:** Suspender 64,52 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profunda.

**Figura 41.** Envase con agar TSI; contenido y preparación.

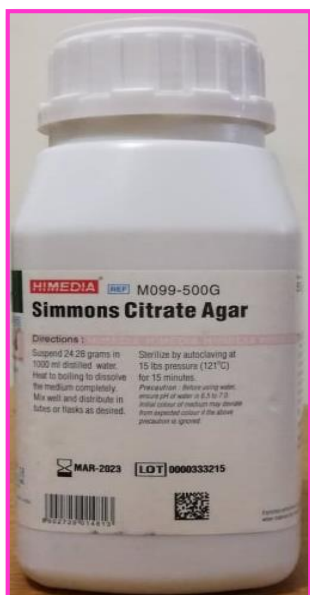


#### Contenido:

Digerido pancreático de gelatina	5,0 g
Extracto de levadura	3,0
Dextrosa	1,0
L-Lisina	10,0
Citrato férrico de amonio	0,5
Tiosulfato sódico	0,04
Púrpura de bromocresol	0,02
Agar	15,0

**Preparación:** Suspender 35 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta profunda.

**Figura 42.** Envase con agar LIA; contenido y preparación.



#### Contenido:

Citrato de sodio	2,0 g
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	1,0
Fosfato monoamónico	1,0
Sulfato de magnesio	0,2
Azul de bromotimol	0,08
Agar	15,0

**Preparación:** Suspender 24,28 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min. Enfriar y dejar solidificar el agar en pico de flauta.

**Figura 43.** Envase con agar Citrato de Simmons; contenido y preparación.



#### Contenido:

Digerido pancreático de caseína	20,0 g
Digerido péptico de tejido animal	6,1
Sulfato ferroso de amonio	0,2
Tiosulfato sódico	0,2
Agar	3,0

**Preparación:** Suspender 36,23 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

**Figura 44.** Envase con medio SIM; contenido y preparación.



**Contenido:**

Mezcla de peptonas	7,0 g
Dextrosa	5,0
Fosfato dipotásico	5,0

**Preparación:** Suspender 17 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

**Figura 45.** Envase con medio MR-VP; contenido y preparación.



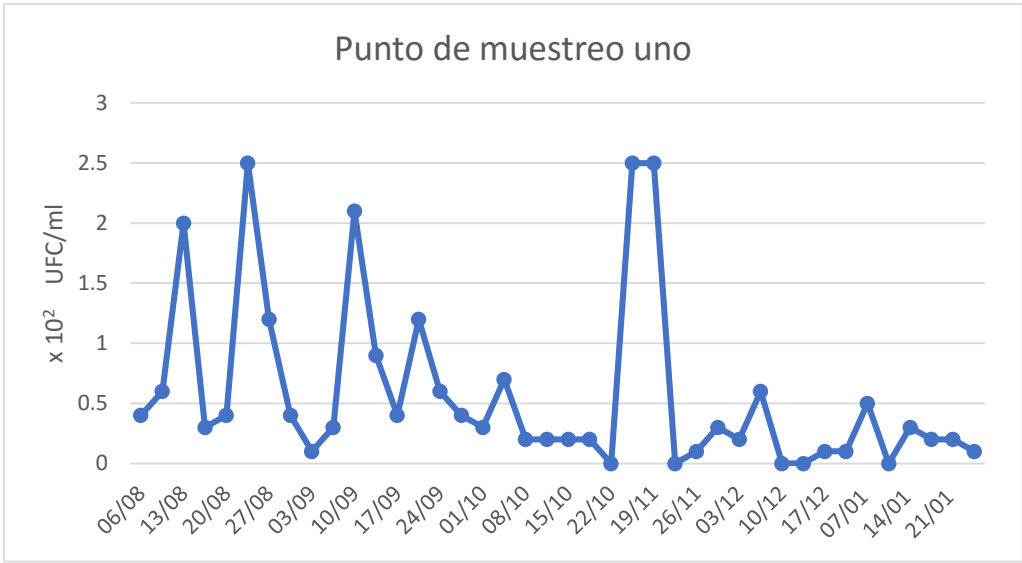
**Contenido:**

Digerido pancreático de gelatina	5,0 g
Extracto de carne bovina	3,0

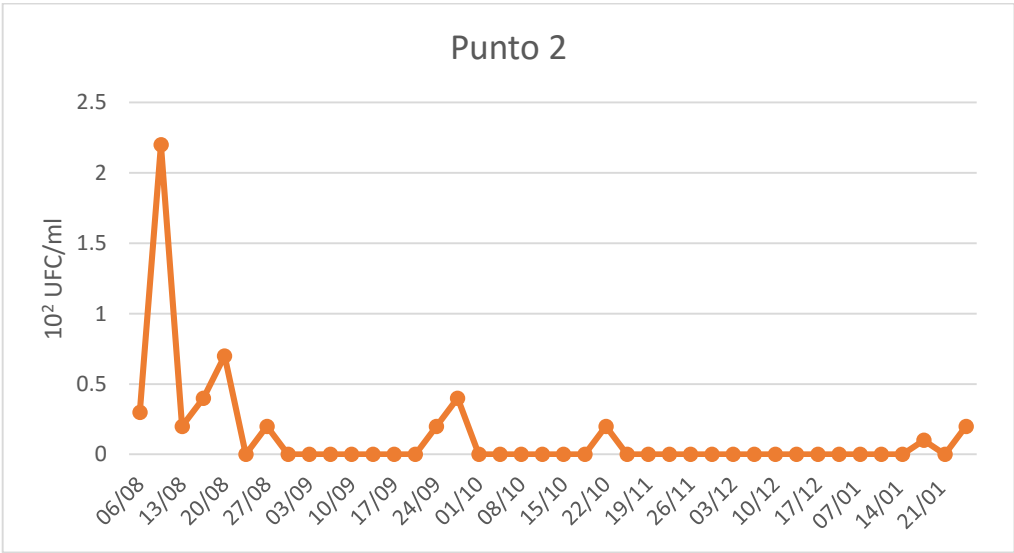
**Preparación:** Suspender 13 gr. en 1000 ml. de agua destilada. Mezclar bien, calentar con agitación frecuente y hervir 1 o 2 min. hasta disolución total. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 121 °C por 15 min.

**Figura 46.** Envase con Caldo Nutritivo; contenido y preparación.

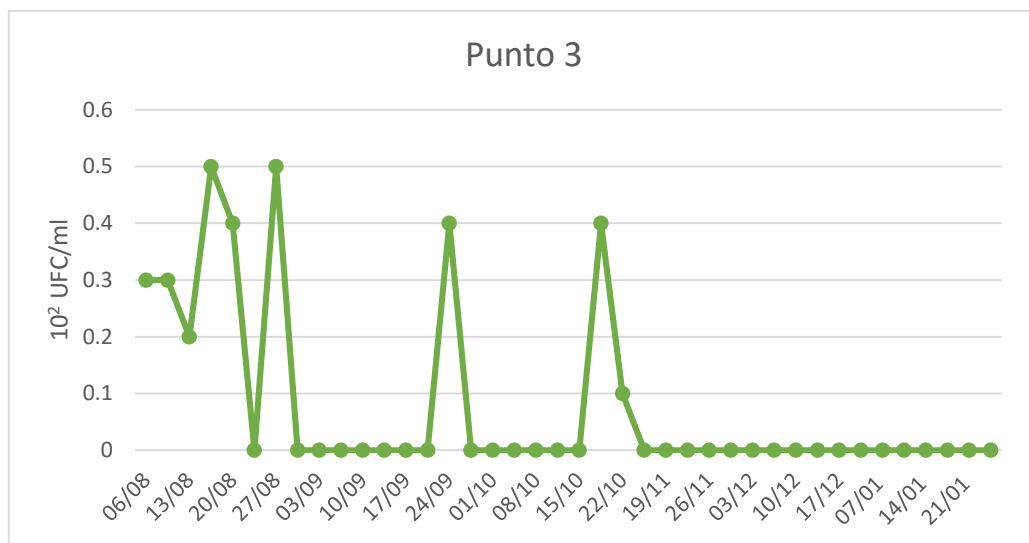
**Anexo 3:** Recuento de UFC/ml por punto de muestreo.



**Gráfico 3.1.** Recuento de UFC/ml de bacterias lactosa-positivas y lactosas-negativas en agar Mc Conkey en el punto de muestreo número uno.

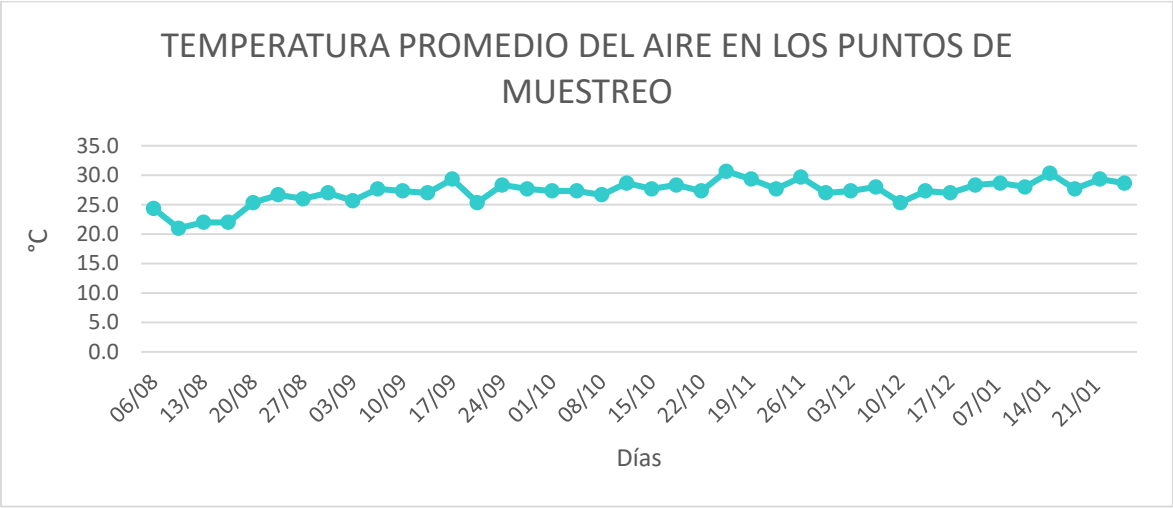


**Gráfico 3.2.** Recuento de UFC/ml de bacterias lactosa-positivas y lactosas-negativas en agar Mc Conkey en el punto de muestreo número dos.



**Gráfico 3.3.** Recuento de UFC/ml de bacterias lactosa-positivas y lactosas-negativas en agar McConkey en el punto de muestreo número tres.

**Anexo 4:** Promedios de pH, temperatura del aire y temperatura del agua.

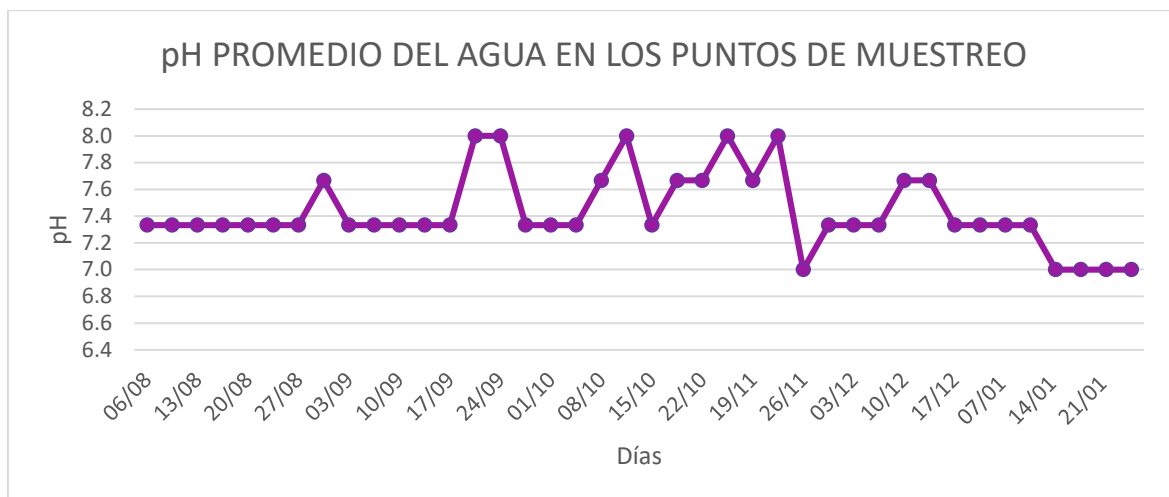


**Gráfico 4.1.** Promedio de la temperatura del aire entre los meses de agosto del 2018 y enero del 2019.



**Gráfico 4.2.** Promedio de la temperatura del agua del río Piura entre los meses de agosto del 2018 y enero del 2019.





**Gráfico 4.3.** Promedio del pH del agua del río Piura entre los meses de agosto del 2018 y enero del 2019.

## **Anexo 5:** Otras bacterias aisladas de aguas del río Piura.

### **Bacterias**

<i>Cedecea davisae</i>
<i>Cedecea neteri</i>
<i>Citrobacter amalonaticus</i> biogrupo 1
<i>Citrobacter freundii</i>
<i>Enterobacter amnigenus</i> biogrupo 1
<i>Enterobacter dissolvens</i>
<i>Enterobacter gergoviae</i>
<i>Enterobacter hormaechei</i>
<i>Enterobacter intermedius</i>
<i>Enterobacter sp</i>
<i>Escherichia hermanii</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sub. <i>Ozanae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> sub. <i>Pneumoniae</i>
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella terrigena</i>
<i>Klebsiella sp</i>
<i>Kluyvera ascorbata</i>
<i>Kluyvera cryocrescens</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Pantoea agglomerans</i>
<i>Serratia ficaria</i>
<i>Serratia fonticola</i>
<i>Serratia grimesii</i>
<i>Serratia marcescens</i>
<i>Serratia odorífera</i> biogrupo 1p
<i>Serratia odorífera</i> biogrupo 2p
<i>Serratia plymuthica</i>
<i>Serratia proteomaculans</i>
<i>Serratia rubidaea</i>
<i>Serratia sp</i>

## Anexo 6: Tabla de identificación bioquímica de *Escherichia coli*.

**Tabla N° 6.1:** Reacciones bioquímicas de miembros de la familia *Enterobacteriaceae*

Prueba	<i>Arsenophonus nasoniae</i> <sup>a</sup>	<i>Budvicia aquatica</i> <sup>b</sup>	<i>Buttiauxella agrestis</i> <sup>c</sup>	<i>Cedecea davisae</i> <sup>d</sup>	<i>Cedecea lapagei</i> <sup>e</sup>	<i>Cedecea neteri</i>	<i>Cedecea especie 3</i>
Catalasa, 24 h	+	+	+	+	+	+	NR
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-
NO <sub>3</sub> →NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+	+
O-F de la glucosa	F	F	F	F	F	F	F
H <sub>2</sub> S (KIA/TSI)	-	V+	-	-	-	-	-
KIA	ALC/A	A/A A/A H <sub>2</sub> S ALC/A H <sub>2</sub> S	A/A	A/A ALC/A	A/A ALC/A	A/A ALC/A	ALC/A
TSI	A/A	A/A A/A, H <sub>2</sub> S ALC/A	A/A	A/A	A/A ALC/A	A/A	A/A ALC/A
<b>Fermentaciones de los hidratos de carbono</b>							
Glucosa y gas	A	Ⓐ	Ⓐ	Ⓐ	Ⓐ	Ⓐ	A
Lactosa	-	V+	A	V-	V	V	-
Sacarosa	A	-	-	A	-	A	V
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinosa	-	V+	A	-	-	-	-
D-Arabitol	NR	V	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	A	A	A	A	A
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-
Eritritol	NR	-	-	-	-	-	-
Glicerol	-	-	V	-	-	-	-
mio-Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Maltosa	-	-	A	A	A	A	A
D-Manitol	-	V	A	A	A	A	A
D-Manosa	NR	-	A	A	A	A	A
Melibiosa	NR	-	A	-	-	-	A
α-Metil-D-glucósido	NR	-	-	-	-	-	V
Mucato	NR	V-	A	-	-	-	-
Rafinosa	-	-	A	V-	-	-	A
L-Ramfosa	-	A	A	-	-	-	-
Salicina	NR	-	A	A	A	A	A
D-Sorbitol	NR	-	-	-	-	-	-
Trehalosa	-	-	A	A	A	A	A
D-Xilosa	-	A	A	A	-	A	A
<b>Reacciones IMViC</b>							
Indol	-	-	-	-	-	-	-
Rojo de metilo (MR)	-	+	+	+	V	+	+
Voges-Proskauer (VP)	-	-	-	V	V+	V	V
Citrato (Simmons)	NR	-	+	+	+	+	+
<b>Reacciones de descarboxilasa/dihidrolasa</b>							
Arginina dihidrolasa	-	-	-	V	V+	+	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	+	+	-	-	-
<b>Reacciones de urea/fenilalanina</b>							
Ureasa (Christensen)	NG	V	-	-	-	-	-
Fenilalanina desaminasa, 24 h	NR	-	-	-	-	-	-
<b>Otras reacciones</b>							
Utilización del acetato	NR	-	-	-	V	-	V
DNasa, 25°C	NG	-	-	-	-	-	-
Hidrólisis de la esculina	-	-	+	V	+	+	+
Licuefacción de la gelatina, 22°C	+	-	-	-	-	-	-
Gluconato	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR
Crecimiento en caldo KCN	NR	-	V+	V+	+	V	+
Lipasa (aceite de cereal)	NR	-	-	+	+	+	+
Utilización del malonato	-	-	V	+	+	+	+
ONPG	NR	+	V	+	+	+	+
Tartrato, Jordon	NR	V	V	-	-	-	-
Movilidad, 36°C/flagelos	-	Vp <sup>aa</sup>	+p	+p	Vp	+p	+p
Pigmentación	-	-	-	-	-	-	-

Fuente: Pruebas bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia Clínica (MacFaddin, 2000).

Continuación de la Tabla N° 6.1

[illegible]

Fuente: Pruebas bioquímicas para la Identificación de Bacterias de importancia Clínica (MacFaddin, 2000).